

QD
1
S923

ARKIV FÖR KEMI

UTGIVET AV

K. SVENSKA VETENSKAPSAKADEMIEN

Band 4

Med 45 avhandlingar

STOCKHOLM

ALMQVIST & WIKSELLS BOKTRYCKERI AB

LONDON

H. K. LEWIS & CO., LTD
136, GOWER STREET

1952

PARIS

LIBRAIRIE C. KLINCKSIECK
11 RUE DE LILLE

Häfte 1—2 innehållande	Nr 1— 9 utkom den	11 aug. 1952
» 3	» Nr 10—17	» » 12 aug. 1952
» 4	» Nr 18—26	» » 29 okt. 1952
» 5	» Nr 27—37	» » 1 dec. 1952
» 6	» Nr 38—45	» » 11 dec. 1952

FJÄRDE BANDETS INNEHÅLL

	Sid.
1. DIANZANI, M. U., Chromatographic analysis of aminoacids and purine and pyrimidine bases in cell fractions from liver and kidney of normal and tumor-bearing rats	1— 6
2. BENNER, K. and MYRBÄCK, K., Inactivation of saccharase and salivary amylase by 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene	7— 10
3. GIACOMELLO, G., The permeability of the red corpuscle membrane for sulfate ions	11— 16
4. JOHANSSON, A., X-ray identification of sugar thiobenzohydrazides	17— 32
5. HOLMBERG, B., Über Thiobenzhydrazide einfacher Zuckerarten	33—162
6. BENDZ, G., 5-Methyl-1,4-naphthaquinone. Synthesis and ultra violet absorption spectrum	163—167
7. VON EULER, H. und HASSELQUIST, H., Zur Kenntnis der Ascorbinsäure und Dehydro-Ascorbinsäure	169—174
8. BYSTRÖM, A., BÄCKLUND, S. and WILHELM, K.-A., The crystal structure of KSbF_4	175—183
9. HELLER, L. and VON EULER, H., Studies in experimental rheumatism. II ..	185—192
10. HAGDAHL, L., WILLIAMS, R. J. P. and TISELIUS, A., Elution and displacement analysis procedures with special reference to chromatography on carbon ..	193—219
11. DEUTSCH, H. F. and GUSTAFSON, T., The changes in catalase and cytochrome oxidase activity in developing sea urchin eggs	221—231
12. EISTERT, B. und HASSELQUIST, H., Über die Umsetzungsprodukte des Triose-Reduktions mit Anilin	233—239
13. RÅNBY, B. G., Physico-chemical investigations on animal cellulose (Tunicin) ..	241—248
14. —, Physico-chemical investigations on bacterial cellulose	249—255
15. BRATTSTEN, I., The moving boundary systems in the electrode compartments in electrophoresis	257—276
16. AUGUSTINSSON, K.-B. and GRAHN, M., Stability of cobra venom acetylcholinesterase and the stabilizing effect of various metallic ions	277—283
17. KIESSLING, K.-H. and LINDAHL, P. E., Cocarboxylase as a phosphate carrier ..	285—287
18. VON EULER, H., Resistenz und Immunität gegen Tumoren. I. Wachsende und retrograde Impftumoren	289—295
19. SANDSTRÖM, J., On the ethyldithiocarbonylhydrazide and its hydrazones	297—323
20. FREDGA, A. & MATELL, M., Studies on synthetic growth substances. III. The steric relations of the optically active α -phenoxy-propionic acid	325—330
21. DI BELLA, S., Versuche über den karyolytischen Effekt normaler und sarkomatöser Seren auf Zellen verschiedener tierischer Organe	331—336
22. HEVESY, G. & DREYFUS, G., Effect of X-rays on the incorporation of ^{14}C into tissue fractions of the mouse	337—361
23. ALEXANDER, E., Thorium B labelled red corpuscles	363—368
24. HASSELQUIST, H., Über einige Derivate der Dehydro-Ascorbinsäure	369—376
25. HEDVALL, J. A., BRIST, C. & LINDNER, R., Selbstdiffusion im Monokalziumferrit ..	377—380
26. LINDNER, R., Diffusion von radioaktivem Eisen in Eisen(3)-oxyd und Zink-Eisen-Spinell	381—384
27. LINDNER, R., Selbstdiffusion im Bleioxyd	385—388

28. HEDVALL, J. A., and CARLANDER, O., Some contributions to the question of crystallographic transition and crystal cracking	389—400
29. DRAKE, B., Chromatography combined with automatic recording of electrolytic conductivity, I. Description of an apparatus and applications to the analysis of amino acids and peptides	401—420
30. LUNDGREN, G., The crystal structure of $U(OH)_2SO_4$	421—428
31. WIDEQVIST, S., Use of ion exchangers for the determination of the velocity of the alkali catalyzed hydrolysis of amides	429—432
32. MYRBÄCK, K., Über die Natur der Stärkegrenzdextrine. I.	433—441
33. VON EULER, B., VON EULER, H. und HASSELQUIST, H., Zur Kenntnis des Buttergelb-Hepatomes und seiner Entstehung. I	443—448
34. GARDELL, S., Some contributions to the technique of analyzing polysaccharides with particular reference to animal mucopolysaccharides.	449—460
35. CARLANDER, A. TH., and GARDELL, S., An automatic fraction collector.	461—467
36. DRAKE, B., and GARDELL, S., Chromatography combined with automatic recording of electrolytic conductivity. II	469—472
37. MATELL, M., Stereochemical studies on plant growth regulators. I. Optically active α -(3,4-dichlorophenoxy)-propionic acid and α -(2,4-dichlorophenoxy)-propionic acid	473—478
38. VON EULER, H., und HASSELQUIST, H., Zum Mechanismus der Decarboxylierung. I	479—485
39. VON EULER, H., HASSELQUIST, H., und ERIKSSON, E., Zur Kenntnis des Buttergelb-Hepatoms und seiner Entstehung. II	487—494
40. MYRBÄCK, K., and PERSSON, B., Enzyme-substrate compounds and activity-pH-curves of the amylases. III	495—502
41. BRATTSTEN, I., Continuous zone electrophoresis by crossed velocity fields in a glass powder column	503—522
42. MYRBÄCK, K., und WILLSTAEDT, E., Über die Natur der Stärkegrenzdextrine. II	523—529
43. MYRBÄCK, K., and PERSSON, B., Inactivation of barley β -amylase by sodium dodecyl sulfate	531—536
44. LUNDBLAD, G., Proteolytic activity in sea urchin gametes. II.	537—565
45. MYRBÄCK, K., and BJÖRKLUND, U., Activity-pH-curves of the enzymatic saccharose and raffinose hydrolysis	567—574

Chromatographic analysis of aminoacids and purine and pyrimidine bases in cell fractions from liver and kidney of normal and tumor-bearing rats

By MARIO UMBERTO DIANZANI

With 1 figure in the text

Many enzymic differences between the organs of normal and tumor-bearing animals were reported in the last years. Particularly strong differences were observed for liver catalase, which was found to be largely decreased in tumor-bearing subjects (GREENSTEIN and JENRETTE (1), VON EULER and HELLER (2), for liver succinodehydrogenase, the activity of which is also decreased (VON EULER a. al. (3), STOLTZ (4), SCHNEIDER and POTTER (5), CARRUTHERS and SUNTZEFF (6), GALICO (7), DIANZANI (8), and of kidney d- and l-aminoacidoxidase (BOULANGER et OSTEUX (9), WESTPHAL (10).

It seemed then very interesting to study chromatographically the problem of the changes which are produced in the organs of tumor-bearing animals, particularly in the attempt to see whether these changes attain also the aminoacids composition of proteins.

Many researches were published in the last years by several authors on the fractionation of liver cells by mean of differential centrifugation.

Very suitable methods for the isolation of cell nuclei were described by VENDRELY and VENDRELY (11) and by DOUNCE (12).

CLAUDE (13), CHANTRENNE (14), SCHNEIDER, HOGEBOOM et al. (15), VON EULER and HELLER (2) have developed methods which permit the isolation of the particulate fraction of cytoplasm (large granules, microsomes).

It appeared very interesting to study chromatographically the aminoacids composition of the cell fractions, particularly with regard to the eventual modifications which can occur in the organs of tumor-bearing subjects.

As it is known, the cytoplasmic granules play a very important role in the metabolism: the most of oxidizing enzymes (cytochromoxidase, succinodehydrogenase, aminoacidoxidase, lacticodehydrogenase and a wide range of other dehydrogenases) are principally linked to these structures. Since they contain also a large amount of RNA (SCHNEIDER (16), BRACHET (17), one may conclude, that they play a very important role in the synthesis of proteins.

Material and methods

Adult rats of the Wallentuna strain were used for these experiments. They were implanted subcutaneously with a small piece of the benzopyrene sarcoma which is cultivated in our Institute. After approximately 2 months, the rats were sacrificed,

and the tumor and the organs (liver, kidney) were removed and weighed. They were then placed into a Petri capsule and conserved in icebox until to the moment of utilization (temperature 2° C).

10 g liver and 2 g kidney were used for each experiment. The organs were homogenized for 3 min. in a mortar and then suspended respectively 20 and 10 ml of concentrated hydrochloric acid. The hydrolysis was started in a warm water bath until complete solution of the material and was then continued for 6 hours by boiling at a temperature of 200–250° C. in a common flask provided with a refrigeration apparatus.

The fractionation of cell was made, in other parallel experiments, starting from the same amounts of tissues which were used for the entire organs. The organs were homogenized for 3 min. in a mortar immersed in an ice bath. They were then suspended in 30 ml (10 for the kidney) of hypertonic (0.88 M) sucrose solution and submitted in a Serval angle centrifuge (Ivan Sorval, 210 Fifth Avenue, New York, U.S.A.) to a centrifugal force of 2000 g for 15 min. With this centrifugation a large sediment, composed of tissue debris, undamaged cells, nuclei, erythrocytes and a little amount of mitochondria, was obtained. This sediment was suspended in 10 ml (5 for the kidney) of sucrose 0.88 M solution and centrifuged in the same conditions. The sediment which was obtained as a consequence of the second centrifugation (fraction A) was conserved for the successive purification of nuclei. The supernatant fluid was added to the one which had been obtained after the first centrifugation and the mixture was submitted to a centrifugal force of 20000 g for 25 min. The sediment after this centrifugation consisted essentially of large granules (mitochondria). It was washed 4 times by suspending it in 20 ml of 0.88 M sucrose solution. The final sediment was employed for the determination (fraction B).

Since we had no centrifuge capable of developing high speed at our disposition, a chemical method was employed for facilitating the sedimentation of the cell particles of smaller size (microsomes). The supernatant after the sedimentation of the mitochondrial fraction was diluted 3 times with physiological saline (0.015 M) solution with the purpose of reducing the density of the fluid. Crystals (30 mg ca) of hydrated CaCl_2 (Merck, Darmstadt) were then added. As it is known, the calcium salts have a weak precipitating action on the nucleic acids, which are contained to a large extent in microsomes.

The fluid was submitted to a new centrifugation at 20000 g for 2 hours. A white sediment was obtained (fraction C). This sediment was again suspended in physiological saline solution and again sedimented by the same procedure. The final sediment contained mainly microsomes, but it cannot be excluded that other nucleic fractions of the fluid part of cytoplasm were included.

The supernatant after the sedimentation of microsomes constituted the fraction D.

For the isolation of nuclei, the fraction A was suspended in 7 % citric acid solution, the procedure of VENDRELY and VENDRELY (l.c.) being then followed. The purification was controlled by microscopical examination.

The hydrolysates were prepared from the cell fractions by the same procedure which was previously described. The entire fractionation procedure was performed in a cold room at the temperature of 2° C. The hydrolysates were neutralized with NaOH. The neutral solutions were then concentrated by evaporation of the water until to reach a final volume of 10 ml for the liver material and of 2 ml for the kidney.

5 normal, 7 tumor-bearing rats and 2 in which the tumor had spontaneously re-

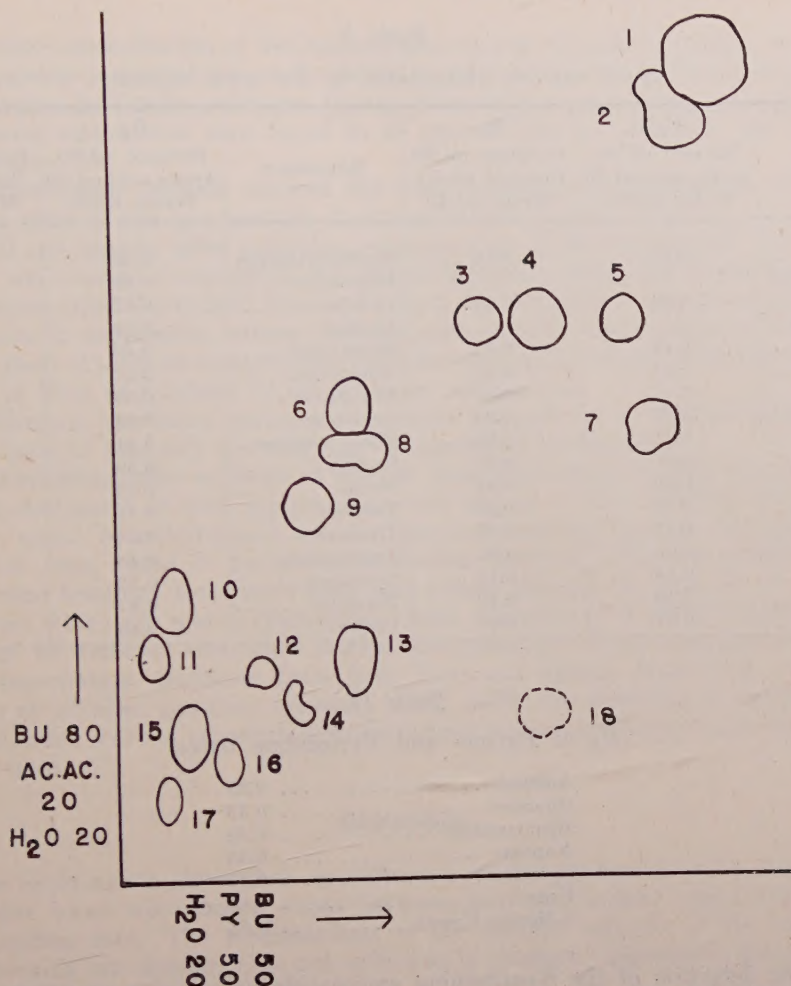


Fig. 1. Aminoacids composition of proteins from rat liver mitochondria. 1) leucine 2) phenyl-alanine 3) valine 4) methionine 5) tryptophane 6) alanine 7) tyrosine 8) proline 9) threonine 10) glutamic acid 11) aspartic acid 12) glycine 13) hydroxyproline 14) serine 15) arginine 16) hystidine 17) lysine 18) methionine- O_2 ?

gressed were used for this investigation, 2 normal and 5 tumor-bearing rats and 1 rat in regression were employed for the cell fractionation experiments.

Chromatographic analysis was performed with the capillar ascension method described by KIRBY and WILLIAMS (18). Two-dimensional chromatograms were made. The first direction solvent was constituted by a mixture of 50 ml pyridine, 50 ml n-butanol and 20 ml water. The second direction solvent was composed of 80 ml n-butanol, 20 ml acetic acid and 20 ml water. Paper Munktell OB was used. The development of the spots of aminoacids was made with a 0.5 % ninhydrin solution. The paper was dried in a thermostate at 70° C.

The R_F values in the used solvents were calculated for a large quantity of aminacids for obtaining the standard controls. The values are collected in the table I.

Table I

 R_F of various aminoacids in the used solvents

Substance	R_F		Substance	R_F	
	Butanol ml/80 Acetic acid ml/20 Water ml/20	Pyridine ml/50 Butanol ml/50 Water ml/20		Butanol ml/80 Acetic acid ml/20 Water ml/20	Pyridine ml/50 Butanol ml/50 Water ml/20
Alanine	0.37	0.19	Hydroxyproline	0.20	0.17
α -amino-butyric acid	0.41	0.25	Isoleucine	0.60	0.40
α -amino-isobu- tyric acid	0.44	0.32	Leucine	0.65	0.49
Arginine	0.14	0.06	Lysine	0.09	0.05
Asparagine	0.12	0.07	Methionine	0.49	0.32
Aspartic acid ..	0.21	0.04	Norleucine	0.67	0.46
Citrulline	0.15	0.05	Norvaline	0.58	0.37
Cysteine	0.07	0.08	Ornithine	0.08	0.03
Cystine	0.06	0.04	Phenylalanine ..	0.61	0.47
Glutamic acid ..	0.23	0.06	Proline	0.39	0.19
Glutamine	0.11	0.07	Serine	0.16	0.14
Glutathione	0.04	0.07	Taurine	0.11	0.16
Glycine	0.18	0.12	Threonine	0.28	0.15
Histamine	0.19	0.10	Tryptophan ...	0.48	0.40
Histidine	0.11	0.08	Tyramine	0.52	—
			Tyrosine	0.37	0.44
			Valine	0.49	0.30

Table II

 R_F of Purine- and Pyrimidine bases

Adenine	0.53
Guanine	0.33
Hypoxanthine	0.38
Xanthine	0.35
Cytosine	0.37
Uracil	0.46
5-Methyl-Uracil	0.63

For the detection of the S-containing aminoacids (which give uncertain results with ninhydrin) both the methods of WINEGARD, TOENNIES and BLOCK (19) (development with a solution consisting of 50 ml 0.066 M KJ and of 50 ml 0.0033 M potassium chloroplatinate) and of CHARGAFF (20) development with 0.05 N iodine solution containing 1.5 % N_3Na) were employed.

For detection of pyrimidine and purine bases, the method of VISCHER and CHARGAFF was used (21). In the table 2 the values which were obtained in the control experiments with 0.2 % solutions of the bases in 0.1 N sulphuric acid are reported.

Results

The same aminoacids composition was found to occur in proteins from both liver and kidney. The following aminoacids were detected in the integral organs: leucine, phenylalanine, tyrosine, tryptophane, valine, methionine, proline, alanine, treonine, glutamic acid, aspartic acid, glycine, serine, hydroxyproline, arginine, lysine, histidine.

By further concentration of the hydrolysates cystine was also detected. In many chromatograms a spot which can be probably referred to as an oxidation derivative of methionine (sulfoxide, sulphone ?) was observed.

The same aminoacids were found to be present also in both liver and kidney mitochondria.

The microsomal fraction showed the same aminoacids composition, with the exception that it was not possible to detect in this fraction tyrosine, the spot of which did not appear after a further concentration of the hydrolysate. No difference in aminoacids composition was found between nuclei and integral organs.

The supernatant fluids from liver and kidney did not show a constant appearance of the spots of methionine, valine, phenylalanine, tyrosine, tryptophan and hydroxyproline. Each of these aminoacids was found however to be present in the supernatant fraction of liver and kidney in almost every experiment.

No difference was found between aminoacids composition of integral organs and cell fractions of normally growing and of regressive rat-tumors.

The chromatographic analysis of nucleic acids derivatives showed the presence in the hydrolysates of both integral liver and kidney of the following substances: cytosine, uracil, 5-methyl-uracil, adenine, guanine, xantine, hypoxantine. All these substances were found to be present in nuclear fractions. The mitochondrial and microsomal fractions from both liver and kidney showed the presence of all the substances which are above enumerated, with exception of 5-methyl-uracil, which could not be detected even after further concentration of the homogenates.

The supernatant fractions from both liver and kidney showed the constant presence of adenine, guanine, cytosine, uracil, while the detection of xantine and of hypoxantine was not constant. 5-methyl-uracil was never detected in the supernatant fractions.

Discussion

These experiments show that no difference in the aminoacids and purine and pyrimidine bases composition exists between liver and kidney from normal and tumor-bearing rats. The modifications of the enzyme activity of the organs of tumor-bearing rats appears then not sufficient to produce variations in the composition of proteins.

The liver and kidney proteins appear to be composed of a wide variety of aminoacids. It is interesting to point out that in mitochondria and nuclei all the aminoacids which are present in the entire organs can be detected. The composition of microsome fraction seems to be very similar to the composition of mitochondria, with the exception of tyrosine, which cannot be detected in microsomes. It is very difficult to say whether this failure is really to be attributed to a different composition of the proteins from microsomes and mitochondria or to the fact that the amount of this aminoacid contained in the microsomes which can be isolated with the procedure used in this investigation, is too small to be detected.

The chromatographic analysis of nucleic acids derivatives shows that only pyrimidine and purine bases which enter in the constitution of ribonucleic acid (adenine, guanine, cytosine, uracil) can be detected in the cytoplasmic fractions, while the nuclei contain, in addition, also 5-methyl-uracil, a component of deoxyribonucleic acid.

This statement is not favourable argument to the claim of ZOLLINGER (22), which,

in base to some changes which were found to occur in isolated mitochondria as a consequence of a treatment with crystalline deoxyribonuclease, suggested the possibility of the existence in these granules of a certain amount of deoxyribonucleic acid.

SUMMARY

The author has investigated the aminoacids and purine and pyrimidine bases composition of liver, kidney and cell fraction from liver and kidney of normal rats and of rats bearing a growing or a regressive tumor.

No difference of chemical composition was found between the tissues of the normal and the cancerous animals.

The aminoacids composition of mitochondria and nuclei is identical to the aminoacids composition of the entire organs. Microsomes show also the same composition, with exception for tyrosine, which cannot be detected in this fraction.

All the purine and pyrimidine bases were found in purified nuclei. 5-methyl-uracil is missing in the cytoplasm fractions.

Stockholm, University, Vitamin Institute.

REFERENCES: 1. Greenstein, J. P., Jenrette, W. V. and White, J., *J. Nat. Cancer Inst.*, **2**, 17, 1914. — 2. v. Euler, H. and Heller, L., *Z. Krebsf.* **56**, 393, 1949. — 3. v. Euler, H., Hellström, H. and Günther, G., *Ark. Kem. Min. Geol.* **12 B**, nr. 38, 1937. — 4. Stolz, E., *J. Biol. Chem.*, **131**, 555, 1939. — 5. Schneider, W. C. and Potter, V. R., *Cancer Research*, **3**, 353, 1943. — 6. Carruthers, C. and Suntzeff, V., *Canc. Tes.* **7**, 9, 1947. — 7. Gallico, E., *Tumori*, **21**, 139, 1947. — 8. Dianzani, M. U., *Tumori*, **36**, 304, 1950. — 9. Boulanger, P. et Osteux, R., *C. R. Soc. Biol.*, **142**, 666 and 668, 1948. — 10. Westphal, M., *Zeit. f. physiol. Chem.*, **276**, 191, 1942; *ibid.* **278**, 213, 1942. — 11. Vendrely, R. et Vendrely, C., **4**, 434, 1948. — 12. Dounce, A. L., *J. Biol. Chem.*, **147**, 685, 1943. — 13. Claude, A., *J. Exp. Med.*, **80**, 19, 1944; *ibid.*, **84**, 51, 1946. — 14. Chantrenne, H., *Enzymologia*, **13**, 213, 1944. — 15. Schneider, W. C., Hogeboom, G. H. and Pallade, G. E., *J. Biol. Chem.*, **172**, 619, 1948. — 16. Schneider, W. C., *J. Biol. Chem.*, **165**, 585, 1946. — 17. Brachet, J., *Embryologie Chimique*, Masson 1947. — 18. Williams, R. J. and Kirby, H., *Science*, **107**, 455, 1948. — 19. Winegard, H. M., Toennies, G. and Block R., *Science*, **108**, 506, 1948. — 20. Chargaff, E., Levine, C. and Green, C. G., *J. Biol. Chemistry*, **175**, 67, 1948. — 21. Vischer, E. and Chargaff, E., *J. Biol. Chem.*, **176**, 703, 1948. — 22. Zollinger, H. N., *Révue d'hématologie*, **5**, 696, 1950; *Experientia*, **6**, 14, 1950.

Tryckt den 18 mars 1952

Uppsala 1952. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

Inactivation of saccharase and salivary amylase by 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene

By KERSTIN BENNER and KARL MYRBÄCK

1-Fluoro-2,4-dinitrobenzene (dinitro-fluorobenzene, DNFB) reacts already at room temperature with primary amino groups forming dinitrophenyl derivatives. Since DNFB, under suitable conditions, does not react readily with other groups, it can, in a sense, be regarded as a fairly specific reagent for free amino groups *e.g.* in peptides. F. SANGER (1) introduced DNFB as a reagent in peptide and protein chemistry for the determination of amino acid residues with free amino groups. In the case of insulin, for instance, the dinitrophenyl derivative was prepared in the following way: 0.5 g crystalline insulin and 0.5 g sodium bicarbonate were dissolved in 10 ml water. 10 ml ethanol and 0.5 g molten DNFB were added and the mixture was shaken for two hours at room temperature. The yellow dinitrophenyl insulin was precipitated. After acid hydrolysis the dinitrophenyl-amino acids formed were identified. SANGER points out that DNFB, under the conditions used, may react slowly also with phenolic hydroxyle, thiole and possibly with thiazole groups.

Our experiments started from the conception that if an enzyme is inactivated under conditions which in themselves do not impair the enzymatic activity, this would tend to show that free amino groups are present in the enzyme molecule and are essential to the enzymatic activity. Furthermore, if the substrate of the enzyme could be shown to protect the enzyme against the inactivating action, this would support the thought that the amino groups belong to the substrate-binding groups of the enzyme.

Our experiments were first carried out with *yeast saccharase*. The existence of substrate-binding amino groups in this enzyme has been assumed earlier by MYRBÄCK (2) on the basis of a calculation of the activity-pH-curve and of inactivation experiments with nitrous acid and other reagents, more or less specific for amino groups. However, our experiments with DNFB could not add much evidence in that direction, since the alkaline pH, necessary for producing a reaction between enzyme and DNFB, destroyed the enzyme fairly rapidly.

DNFB was prepared, according to the directions given by H. B. GOTTLIEB (3), from 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (100 g) and potassium fluoride. 68.3 g crude DNFB was recovered. M.p. after recrystallization from ether 23.5°. The substance is sparingly soluble in water; the solubility in N NaHCO₃ at 25° was found to be about 150 mg/liter. The alkaline solution is deep yellow; the colour vanishes on acidification.

In the inactivation experiments an excess of solid, finely powdered DNFB was used and the reaction mixtures were shaken gently to secure saturated solutions.

Table 1

Treatment of enzyme	Activity observed	
	With DNFB	Without DNFB
No treatment (2.5 ml enzyme + 2.5 ml water)		100
2 hrs at pH = 4.5; no ethanol	105	105
2 hrs at pH = 4.5; ethanol	100	100
2 hrs at pH = 7.2; ethanol	65	68
2 hrs at pH = 7.7; ethanol	24	50
18 hrs at pH = 7.7 and 4°; ethanol	100	100
2 hrs at pH = 8.2; no ethanol	24	24
15 min. at pH = 8.2; ethanol	46	60
2 hrs at pH = 8.2; ethanol	20	46

A saccharase preparation was obtained from baker's yeast according to directions given in BAMANN-MYRBÄCK (4). 5 ml enzyme solution were added to 45 ml buffer solution containing 2.375 g saccharose (pH = 4.5) at 25°. Samples of 5 ml were taken after different times and added to 10 ml 2 N sodium carbonate solution. The hydrolysis was followed polarimetrically. In the inactivation experiments 5 ml buffer solution were shaken, at room temperature if not otherwise stated, with an excess of DNFB and 5 ml enzyme solution. After different reaction times 5 ml of the mixture were added to a sugar solution containing a suitable buffer to bring the final pH to 4.5. Sugar concentration as above. Table 1. No action of DNFB was found at pH = 4.5 in phosphate buffer. At pH = 8.2 (saturated bicarbonate solution) nearly complete inactivation was found both with and without DNFB. Other experiments were carried out in the presence of ethanol in order to secure a higher concentration of DNFB in the solution: 5 ml enzyme solution were added to DNFB in 3 ml ethanol and 2 ml buffer solution. No inactivation was found at pH = 4.5 or 5.5. At pH = 7.2 a slight inactivation was found both with and without DNFB. At pH = 7.7 (phosphate) and room temperature the inactivation with DNFB was found to be considerably greater than the inactivation caused by the ethanol-buffer solution alone. In more alkaline solutions a stronger inactivation was caused by DNFB. However, since the enzyme is rather unstable in these solutions it does not seem to be possible to draw any reliable conclusions. Experiments were also carried out with methanol, dioxane or acetone instead of ethanol. With dioxane no inactivation was obtained; methanol and acetone inactivated strongly.

Salivary amylase is very stable in alkaline solutions up to pH = 11, and experiments with this enzyme could be expected to yield less doubtful results. Filtered saliva was used; 2 ml were added to a mixture of solid DNFB and 2 ml buffer solution. The mixture was shaken gently for a certain time. 0.5 ml was then added to a mixture containing 20 ml 2 % starch solution, 4 ml buffer and 0.5 ml 1 % sodium chloride solution. The pH of the final mixture was 6.9. It was kept at 25° and after 5 and 10 minutes 10 ml samples were pipetted into 5 ml 0.1 N iodine-KJ solution. Reducing sugar was determined according to WILLSTÄTTER and SCHUDEL. It was found (Table 2) that practically no inactivation occurred at pH = 7.6 but a strong inactivation at pH = 8.2. At pH = 8.5 the activity was nearly completely abolished by DNFB after 2 hrs at 18°, whereas the buffer alone was without any action on the enzyme. The inactivation was still more complete at pH = 8.5 and 25°. Already

Table 2

Treatment of enzyme	Relative enzyme activity	
	With DNFB	Without DNFB
No treatment (1 ml amylase + 1 ml water). Three experiments		100
2 hrs at pH = 7.6. Two expts.	88	95
20 min. at pH = 8.2	87	100
2 hrs at pH = 8.2	33	97
15 min. at pH = 8.5 and 18°	80	95
2 hrs at pH = 8.5 and 18°	15	97
15 min. at pH = 8.5 and 25°	45	—
2 hrs at pH = 8.5 and 25°	6	100

after 15 minutes a strong inactivation could be observed. In experiments at pH = 9–10 the inactivation was complete but the enzyme was damaged by the buffers alone at these pH's. A series of experiments with an other sample of saliva gave the same result (Table 3).

In the following series of experiments the influence of starch and maltose on the inactivation was studied. (Starch is degraded only very slowly at pH = 8.5 under the conditions used.) 0.282 g Na_2HPO_4 was dissolved in 2 ml 10 % solution of starch or maltose or in water respectively. Solid DNFB and 8 ml saliva (diluted 1:4) were added and the mixture was shaken gently at 25°. Immediately and after 15, 30, 60 and 120 minutes 2 ml samples were removed and mixed with an equal volume of a solution of KH_2PO_4 . The pH of the mixture was 5.1. The enzyme is completely stable at this pH, and DNFB has no inactivating effect. 2 ml of this solution were added to a mixture of 40 ml 2 % starch solution, 1 ml 1 % Na Cl solution, 2 ml phosphate buffer and 5 ml water. The pH of the buffer was such, that the final pH was 6.7–6.9. Samples were taken after 0.5, 4, 8 and 12 minutes and reducing sugar was determined as above (Table 4). The experiments show that starch and maltose exert a considerable protecting action. It seems, therefore, permissible to assume that there is a competition between DNFB and the substrate (or maltose) and that amino groups of the enzyme are involved in the enzyme-substrate compound formation, since DNFB can be supposed to act on primary amino groups in the enzyme molecule. This result is in agreement with earlier experiments on the inactivation of the enzyme (2). In this connection it may be mentioned that, in the case of saccharase, the investigation of the pH-curve at different substrate concentrations, and of the inactivation of the enzyme by certain reagents, basic groups, probably amino groups,

Table 3

Treatment	Relative enzyme activity
Not treated	100
15 min.	65
30 min.	40
60 min.	25
120 min.	8

Table 4

Treated with DNFB, minutes	Relative enzyme activity		
	Enzyme + water	Enzyme + starch	Enzyme + Maltose
Not treated.....	100	100	100
15 min.	33	61	53
30 min.	19	47	42
60 min.	3	42	33
120 min.	0	19	22

are involved in the attachment of the substrate to the enzyme, whereas acid groups in the enzyme molecule have nothing to do with the binding of the substrate but are indispensable for the enzymatic reaction proper, taking place in the enzyme-substrate compound (2). It was shown later on that the same conception offers a very reasonable explanation of the dependence of the urease activity upon pH and substrate concentration (5). Furthermore, the same ideas can be applied to the pH-curves of certain amylases (6). WILSON (7) has recently advanced much the same explanation in the case of cholinesterase. It seems that we have reason to ask, if it is not a common feature of many hydrolyzing enzymes, that basic groups in the enzyme molecules are instrumental in the attachment of the substrate and that acidic groups in the neighbourhood of the substrate-binding groups are necessary to producing the enzymatic reaction in the enzyme-substrate compound.

The inactivation of salivary amylase by DNFB seems to be rapid only in alkaline solutions, at pH's rather close to those at which irreversible inactivation occurs through the action of the alkaline reaction or the alkaline buffer solution alone. Our experiments suggest that in the alkaline solutions a denatured form of the enzyme (perhaps present in small amounts also in neutral solution) is produced, which reacts with DNFB. The "unwinding" of the polypeptide chains supposed to occur in protein denaturation may aid in making the amino groups accessible to the inactivating agent.

LITERATURE: 1. Sanger, F., *Biochem. J.* 39, 507 (1945) and 40, 261 (1946). — 2. Myrbäck, K., *Z. physiol. Chem.* 158, 160 (1926) and 159, 1 (1926). — 3. Gottlieb, H. B., *J. Am. Chem. Soc.* 58, 532 (1936). — 4. Bamann, E. and Myrbäck, K., *Die Methoden der Fermentforschung*, Georg Thieme, Leipzig 1941. — 5. Myrbäck, K., *Acta Chem. Scand.* 1, 142 (1947). — 6. Myrbäck, K., *Arkiv Kemi*, 3, 437 (1951). — 7. Wilson, I. B., *Biochim. et Biophys. Acta* 7, 466 (1951).

Tryckt den 18 mars 1952

Uppsala 1952. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

The permeability of the red corpuscle membrane for sulfate ions¹

By G. GIACOMELLO

With 1 figure in the text

The opinions concerning the permeability of the red corpuscle membrane toward sulfate ions have been very diverse. For instance, the papers of BOURDIL-
LON and coll. (1) and more recently the work of PETERS and coll. (2) have supported the impermeability of this membrane. On the other hand the classic investigations of H. I. HAMBURGER (3) advanced the theory of its permeability. Naturally the work in all their investigations was of chemical nature, involving the addition of sodium sulfate to blood under various conditions.

As in the case of the phosphate ion (4), the only method which permitted the solution of the question was the application, as Prof. HEVESY suggested to me, of radiochemical methods.

In the laboratory of HEVESY, ZERAHN has already made qualitative investigations on this problem, adding for every cc. of rabbit's blood 0.05 cc. of an isotonic solution of sodium sulfate containing radioactive sulfur: he found a distribution coefficient between the corpuscles and plasma of 0.3 after 30 minutes and of 0.45 after 162 minutes (5).

It was attempted in this work to establish quantitatively the permeability at 37° C. and at other temperatures, using very small amounts of radioactive sulfate in order not to vary to an appreciable degree the natural composition of the blood. The experiments were divided in two parts:

- a) those of less than two hours' duration
- b) those of longer time.

The investigations were conducted in parallel with heparinized blood of rabbits, man, and hens. Several were made with the addition of an iso-osmotic solution of non-radioactive sodium sulfate in order to follow the transfer process of sulfate ions from plasma to red blood cells. Thus it was also possible to reduce the eventual reaction which can take place when very minute amounts of Na_2SO_4 are added.

¹ These investigations were made at the "Institutet för organ. Kemisk Forskning" of the University of Stockholm. I wish to express my appreciation to Prof. G. HEVESY who instructed me in radiochemical methods and who followed this work with interest. In addition I wish to thank the Accademia Naz. dei Lincei which gave me a grant from the "Fondazione Donegani" which made possible my period of work abroad.

Experimental

a) Experiments of about two hours' duration.

In these investigations there were used a solution of radioactive sulfuric acid (0.076 N), neutralized and made isotonic to plasma with sodium bicarbonate, and an iso-osmotic solution of sodium sulfate and sodium bicarbonate.

Of the first solution (Sol. I) 7 mg were added to 10 cc. of heparinized blood. Of the second (Sol. II), which was much more radioactive, 1.15 mg were added for the same amount of blood.

In all these experiments the heparinized blood, to which the radioactive solution was added, was placed in a 5 cc. test tube which was closed tightly with a rubber stopper, placed in a thermostat and rotated very slowly for the desired period of time. After the time indicated in the case of each experiment, the plasma was separated from the red corpuscles by centrifugation. The red corpuscles were washed with non-radioactive plasma from the same source, or with physiological solution at 0°. The plasma and red corpuscles were weighed and evaporated to dryness in an oven at 95° to constant weight.

The radioactivity of the dried product was measured and from this value the radioactivity of the plasma and red corpuscles in the normal state was calculated. These results of the individual experiments are reported in table I.

One part of the red corpuscles in experiments 3 and 4 were treated with non-radioactive plasma to which was added a solution of non-radioactive sodium sulfate in the same concentration used in solution I. Naturally plasma was added in such amounts to the red corpuscles to maintain the rate existing normally.

One sample was kept in the thermostat at 37° for one hour, the other for two hours. In the first case there resulted a distribution of the radioactivity between the red corpuscles and plasma of equal weight of 0.43. In the second case this rate had the value of 0.40. These values are similar to those obtained in the experiments of two hours' duration; this would tend to indicate that the exchange process between the intracellular sulfate and the plasma sulfate is relatively rapid, and, in contrast to the behavior of the phosphate ions, for the sulfate ions there are no other processes which are superimposed upon the exchange reaction to a noticeable degree.

Table I

Experiment	Solution added	Temperature	Time (min.)	Activity/g corpuscles	Activity/g red corpuscles water
				Activity/g plasma	Activity/g plasma water
1	Sol. I	37°	20	0.176	0.258
2	»	37°	135	0.437	0.638
3	»	37°	60	0.371	0.542
4	»	37°	120	0.426	0.622
5	Sol. II	37°	120	0.384	0.570
6	»	37°	120	0.403	0.591
7	Sol. I	5°	60	0.056	0.082
8	Sol. II	5°	60	0.058	0.085
9	»	5°	120	0.062	0.091
10	Sol. I	0°	60	0.025	0.037
11	Sol. II	0°	120	0.031	0.045

Table II

Experi- ment	Solution added	Tempera- ture	Time (min.)	Activity/g corpuscles	Activity/g red corpuscles water
				Activity/g plasma	Activity/g plasma water
1	Solution II + 1 cm ³ of isotonic solution of non radioactive sodium sulfate	37°	15	0.165	0.240
2		37°	120	0.448	0.653
3		37°	120	0.427	0.622
4		5°	60	0.060	0.087
5		0°	120	0.041	0.059

Table III

Experi- ment	Tempera- ture	Time (hours)	Activity/g corpuscles	Activity/g red corpuscles water
			Activity/g plasma	Activity/g plasma water
1	37°	6 ^h	0.549	0.83
2	37°	4 ^h	0.666	0.97
3	37°	8 ^h	0.700	1.02
4	37°	6 ^h	0.690	1.00

If, instead of considering the distribution coefficient of activity of red corpuscles and activity of plasma of equal weight, the relation between red corpuscle water and plasma water of equal weight is considered, for the experiments lasting two hours, there is a value of 0.6, similar to that value obtained for chloride ions.

a') Experiments of less than two hours' duration with heparinized blood to which an isotonic solution of non-radioactive sodium sulfate was added.

In order to minimize eventual reactions which could occur exclusively from the radioactive sodium sulfate, in addition to this substance, for every 10 cc. of blood there was added 1 cc. of an isotonic solution of non-radioactive sodium sulfate. The results obtained are reported in table II.

From these experiments it is evident that the distribution of radioactivity between the red corpuscles and plasma does not vary appreciably, within the limits of experimental error, from that observed in the analogous experiments of the first series.

b) Experiments lasting longer than two hours.

Experiments of long duration are not to be recommended due to the alteration which can occur in blood held in a thermostat over a considerable period of time. However, it was desirable to perform several experiments of this type to determine if the value obtained in experiment 2 (table I) was due to the longer duration of the experiment. Also in these experiments there was added for each 10 cc. of blood either the radioactive solution I (Exp 1) or rather solution II (Exp 2, 3, 4), with the addition of 1 cc. of an isotonic solution of non-radioactive sodium sulfate. The results are reported in table III. From these values it is evident that, for ex-

Table IV

Experiment	Time	BaSO ₄ obtained at Start of Exp. in mg	BaSO ₄ obtained at End of Exp. in mg	BaSO ₄ corresponding to sulfate ions transferred from plasma to red corpuscles
1	0 ^h	15.4		
2	3 ^h		13.3	2.1
3	0 ^h	15.6		
4	3 ^h		13.6	2.0
5	0 ^h	15.9		
6	6 ^h		13.6	2.3

periments of long duration, the coefficient of distribution of $^{35}\text{SO}_4^{--}$ between the red corpuscles and plasma of equal weight can amount to 0.7. If this distribution coefficient is referred to equal amounts of water contained in red corpuscles and plasma, the value approaches unity. This indicates that in experiments of long duration in the exchange of sulfate ions between plasma and corpuscles, the exchange of other types of ions as for example chloride ions, bicarbonate ions, etc., must be considered.

Chemical determination of sulfate ions which are transferred from the plasma to the red corpuscles, following the addition of an iso-osmotic solution of sodium sulfate to the blood

In this series of experiments 1 cc. of an iso-osmotic solution of non-radioactive sodium sulfate mixed with negligible amounts of radioactive sodium sulfate was added for every 10 cc. of blood. From this blood six samples were taken, three of which were centrifuged immediately, and the other three were placed in the thermostat at 37°. Of these latter, two were centrifuged after two hours, and the third after six hours. The determination of the sulfate ions was made according to the method of Pregel on equal portions of deproteinized plasma adding equal amounts of solutions of 20 % trichloroacetic acid. From each deproteinized solution, a volume of liquid corresponding to 51.37 % of the original plasma was taken. The results are reported in the accompanying table (table IV).

From the table the following conclusions may be drawn. First, by increasing the concentration of sulfate ions in the plasma, there results a transfer of sulfate ions into the red corpuscles. Second, this transferal can be considered to be practically complete after three hours. Third, without taking into account the quantity of sulfate ions which may have entered the red corpuscles during the period of mixing and centrifugation, it results that at least 13.25 % of sulfate ions found in the samples which were not placed in the thermostat have been transferred after 3 hours and 14.48 % after 6 hours. At the same time the radioactivity of these samples was measured. After three hours 29.3 % of the initial radioactivity of the plasma was found in the red corpuscles, and 33.5 % after six hours.

This would indicate that the equilibrium of simple diffusion is stabilized more rapidly than that of transfer.

Since, also in the experiments of long duration, the rate between the radioactivity of the red corpuscles and that of the plasma both referred to equal amounts

Table V

Duration of Experiment in minutes	10'	60'	120'
$\frac{\text{Activity/g corpuscles}}{\text{Activity/g plasma}}$ (man)	0.042	0.235	0.344
$\frac{\text{Activity/g corpuscles}}{\text{Activity/g plasma}}$ (rabbit)	0.102	0.371	0.426
$\frac{\text{Activity/g corpuscles}}{\text{Activity/g plasma}}$ (hen)	—	0.169	0.225

of water-content does not pass unity, it is evident that with the processes of endo- and exo-cellular diffusion there is a tendency for the concentrations of the sulfate ions present in the two phases to become equal. In fact, as the experiments show, the results obtained from treating the radioactive red corpuscles with non-radioactive plasma indicate that the sulfate ions do not react to an appreciable degree with the substances contained in the red corpuscles. In contrast to the behavior with the phosphate ions, the red corpuscles rapidly release the radioactive sulfate ions to the plasma. In general, after two hours, the ratio of the division of the radioactive sulfate ions between equal amounts of red corpuscles water and plasma water approaches 0.6, as was previously found with chloride ions.

In the experiments of longer duration, besides the interchange of the sulfate ions between plasma and red corpuscles, there can also occur an interchange of other types of ions, and this rate can approach unity.

Distribution of sulfate ions between plasma and red corpuscles in the blood of the rabbit, man, and the hen

In the same manner, as in case of the phosphate ions, the permeability for sulfate ions of the membrane of the red corpuscles of man and the nucleated corpuscles of the hen has been determined. The results of the experiments performed at 37° are reported in table V. They show that the permeability of the red corpuscle membrane for both phosphate and sulfate ions decreases in the same order passing from the blood of the rabbit to that of man and the hen, as indicated in the attached graph (Fig. 1).

Considering the fact that the total surface area of the red corpuscles contained in 1 mm.³ of blood is 648 sq.mm. for the rabbit, 492 sq.mm. for man, and 637.9 sq. mm. for the hen, it is not difficult to explain the diminished permeability observed in passing from rabbit's blood to that of man; however it does not explain the still smaller permeability observed for the red corpuscles of the hen, in which the surface area is comparable to those of the rabbit. Evidently in the case of these nucleated corpuscles there must participate to a decisive degree also other factors closely related to their particular nature.

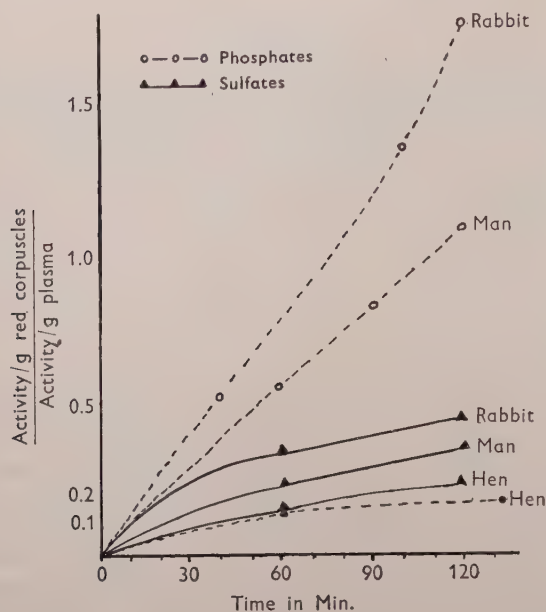


Fig. 1.

SUMMARY

It has been established that in vitro the red corpuscle membrane is permeable to sulfate ions. Also, if the concentration of sulfate ions in the plasma is increased, part of these ions are transferred into the red corpuscles.

For the sulfate ions, the permeability of the red corpuscle membrane in the rabbit is greater than that of the red corpuscle membrane of man, and this in turn is larger than that of the red corpuscles of the hen, as also has been observed with phosphate ions.

REFERENCES: 1. Bourdillon and Associates, *J. Clin. Inves*, 15, 301 (1936). Wieckmann, E. *Arch. ges. Physiolog.*, 189, 109 (1921). D. L. Woodhouse, F. A. Pechworth, *Bioch. Journal*, 26, 309 (1932). — 2. P. M. Hold, A. J. Heinsen, J. P. Peters, *The Am. Journal of Physiology*, 152, 77 (1948). — 3. H. J. Hamburger, *Biochemische Zeitschr.*, 86, 309 (1918). — 4. A. J. Eisenman, L. Ott, P. K. Smith, A. Winkler, *J. of Biological Chem.*, 135, 165 (1940). — 5. G. Hevesy, *Radioactive Indicators*, Interscience Publishers, New York (1948), pag. 481.

Tryckt den 18 mars 1952

Uppsala 1952. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

X-ray identification of sugar thiobenzohydrazides

By AXEL JOHANSSON

With 7 figures in the text

1. Introduction

In order to facilitate the identification of minute amounts of sugars, it was proposed by Professor HOLMBERG that the author should determine the X-ray powder diffraction data for the series of sugar thiobenzohydrazides which are described in the following paper (1). This examination has been carried out, both for the individual substances and for some binary mixtures of them. In addition data has been collected for the 5-polyhydroxyalkyl-2-phenyl-1,3,4-thio-diazoles, which are obtained by treating the thiobenzohydrazides with weak oxidizing agents; the former compounds are of interest because they are very easily purified, and also because they are often formed by atmospheric oxidation of the thiobenzohydrazides.

2. Experimental

The compounds used in this investigation were supplied by HOLMBERG; for each compound the page reference to the original paper (1) is given in the last column of the text accompanying each figure. The diagrams were recorded with cameras of the type described by GUINIER (2), and good patterns were obtained using Cu- $K\alpha$ radiation and an exposure time of about two hours. The cut-off was at about 20 Å, and reflections corresponding to greater spacings could not be obtained. The lines of the patterns were measured with the aid of a scale printed on the film, in order to eliminate errors due to film shrinkage (3). The d -values (in Å units) of the lines of the patterns have been tabulated together with a relative intensity value for each line. The intensities were simply estimated visually on a comparative basis, the strongest line present being assigned a value of 10.

3. Thiobenzohydrazides

The powder diffraction data for the sugar thiobenzohydrazides are listed in Tables 1-11 and the corresponding patterns are reproduced in Fig. 1. From these data it is obvious that the patterns are sufficiently different to render identification of a sugar easily possible. In Table 12 the three strongest lines

A. JOHANSSON, *X-ray identification of sugar thiobenzohydrazides*

	Thiobenzohydrazide of	M.p., °C	Page (1)
	<i>D</i> -Ribose	140-141	54
	<i>D</i> -Arabinose	167-168	50
	<i>L</i> -Arabinose	167-168	47
	<i>D, L</i> -Arabinose	161-162	50
	<i>D</i> -Xylose	117-118	51
	<i>D</i> -Lyxose	170-171	53
	<i>L</i> -Rhamnose	175-176	55
	<i>D</i> -Glucose	183-184	57
	<i>D</i> -Mannose	192-193	59
	<i>D</i> -Galactose	180-181	61
	<i>D</i> -Fructose	175-176	63
	<i>L</i> -Sorbose (with H ₂ O)...	66- 68	66
	<i>L</i> -Sorbose (with C ₂ H ₅ OH)	68- 72	66

Fig. 1. Powder patterns of sugar thiobenzohydrazides.

from each pattern are collected and tabulated in the order of decreasing *d*-values. As can be seen from this table the patterns may be distinguished by these lines alone.

It is to be noted that *D, L*-arabinose thiobenzohydrazide, m. p. 161-162°, gives a pattern which is quite different from that of the derivative of the *D*- or *L*-sugar, melting at 167-168°. In this case a real racemic compound evidently exists. The diffraction data for the two active forms are given as an example of the reproducibility of the method.

X-ray diffraction data for thiobenzohydrazides

Table 1
D-Ribose derivative

<i>I</i>	<i>d</i>	<i>I</i>	<i>d</i>	<i>I</i>	<i>d</i>	<i>I</i>	<i>d</i>
8	12.0	6	4.25	1	3.30	1	2.49
3	5.22	10	3.93	1	3.22	1	2.45
1	5.17	1	3.87	3	3.08	2	2.315
2	4.93	2	3.65	2	2.92	1	2.260
8	4.74	2	3.61	1	2.85	1	2.225
2	4.68	2	3.48	1	2.79	1	2.180
3	4.55	1	3.37	1	2.67	1	2.030
5	4.31	2	3.23	1	2.59	1	1.990

Table 2

D-Arabinose derivative		L-Arabinose derivative		D, L-Arabinose derivative	
<i>I</i>	<i>d</i>	<i>I</i>	<i>d</i>	<i>I</i>	<i>d</i>
7	14.8	6	14.8	7	12.5
7	7.7	7	7.8	4	6.24
2	5.75	1	5.78	10	4.97
3	4.97	2	4.96	9	4.40
8	4.61	8	4.60	2	4.15
9	4.55	9	4.55	2	4.01
8	4.25	8	4.24	2	3.83
10	4.20	10	4.20	8	3.57
7	4.07	6	4.07	1	3.27
6	3.95	5	3.90	2	3.04
4	3.69	4	3.68	2	2.93
2	3.64	3	3.63	1	2.82
4	3.45	2	3.45	1	2.75
		1	3.39	1	2.58
5	3.29	3	3.29	1	2.48
4	3.22	2	3.21	1	2.360
4	3.15	3	3.15	1	2.305
2	3.03	2	3.03	1	2.195
		1	2.93	1	2.120
4	2.89	3	2.90	1	1.900
3	2.61	2	2.61	1	1.845
		1	2.55	1	1.780
3	2.50	2	2.50		
2	2.44	2	2.430		
2	2.370	1	2.360		
3	2.280	2	2.280		
		1	2.260		
3	2.210	2	2.220		
1	2.140	1	2.135		
1	2.070	1	2.065		
1	2.010	1	2.030		
1	1.880				
1	1.830	1	1.825		
1	1.800	1	1.795		
1	1.675	1	1.675		
1	1.655	1	1.655		

Table 3
D-Xylose derivative

<i>I</i>	<i>d</i>	<i>I</i>	<i>d</i>	<i>I</i>	<i>d</i>	<i>I</i>	<i>d</i>
7	13.4	5	3.77	2	2.68	1	2.150
9	5.06	3	3.62	3	2.59	1	2.090
4	4.57	1	3.46	4	2.50	1	2.060
4	4.45	3	3.33	2	2.405	1	2.030
4	4.32	1	3.14	1	2.355	1	1.995
10	4.19	1	3.06	1	2.270	1	1.895
1	4.06	2	2.90	2	2.225	1	1.860
5	3.92	2	2.76	1	2.185	1	1.635

Table 4
D-Lyxose derivative

<i>I</i>	<i>d</i>	<i>I</i>	<i>d</i>	<i>I</i>	<i>d</i>	<i>I</i>	<i>d</i>
3	18.1	8	4.42		3.18	3	2.54
7	8.8	8	4.03	3	3.05	3	2.250
6	7.05	7	3.85	2	2.99	1	2.215
10	5.75	5	3.53	2	2.90	1	2.015
2	4.74	5	3.48	3	2.74	1	1.920
9	4.65	1	3.35	2	2.58		

Table 5
L-Rhamnose derivative

<i>I</i>	<i>d</i>	<i>I</i>	<i>d</i>	<i>I</i>	<i>d</i>	<i>I</i>	<i>d</i>
8	15.4	5	4.38	2	3.35	2	2.480
3	12.0	2	4.32	3	3.27	2	2.390
2	7.20	2	4.19	2	3.19	1	2.270
2	5.90	1	4.01		3.00	1	2.125
2	5.17	7	3.85	1	2.85	1	2.000
3	4.98	6	3.68	1	2.78	1	1.895
10	4.78	5	3.64	1	2.70	1	1.840
5	4.48	1	3.45	1	2.59		

Table 6
D-Glucose derivative

<i>I</i>	<i>d</i>	<i>I</i>	<i>d</i>	<i>I</i>	<i>d</i>	<i>I</i>	<i>d</i>
8	14.8	6	4.88	3	3.81	2	2.68
4	9.4	6	4.68	5	3.63	2	2.53
4	9.0	10	4.50	5	3.53	2	2.49
3	6.78	5	4.44	4	3.31	2	2.45
4	6.02	5	4.38	2	3.26	7	2.325
3	5.85	4	4.20	2	3.12	1	2.280
3	5.36	4	4.12	1	2.97	1	2.040
6	5.07	5	3.96	2	2.89		

Table 7
D-Mannose derivative

<i>I</i>	<i>d</i>	<i>I</i>	<i>d</i>	<i>I</i>	<i>d</i>	<i>I</i>	<i>d</i>
6	15.1	1	4.39	3	3.20	1	2.230
4	7.50	3	4.15	2	2.94	1	2.160
1	5.07	4	3.77	1	2.83	1	2.060
1	4.93	1	3.60	1	2.73	1	2.020
1	4.83	8	3.53	1	2.67	1	1.880
10	4.66	3	3.41	1	2.350	1	1.755
5	4.47	3	3.28	1	2.300		

Table 8
D-Galactose derivative

<i>I</i>	<i>d</i>	<i>I</i>	<i>d</i>	<i>I</i>	<i>d</i>	<i>I</i>	<i>d</i>
5	15.7	3	3.55	2	2.56	2	2.110
7	7.7	4	3.49	2	2.53	2	2.085
4	5.81	4	3.37	2	2.51	2	2.030
4	5.28	2	3.34	2	2.47	2	2.000
3	5.17	7	3.27	2	2.44	1	1.975
3	4.54	1	3.05	3	2.405	1	1.930
10	4.42	1	3.02	2	2.325	1	1.900
9	4.31	2	2.92	1	2.290	1	1.810
1	4.18	3	2.87	2	2.255	1	1.790
2	4.00	2	2.74	2	2.215	1	1.745
6	3.83	2	2.62	1	2.195		

Table 9
D-Fructose derivative

<i>I</i>	<i>d</i>	<i>I</i>	<i>d</i>	<i>I</i>	<i>d</i>	<i>I</i>	<i>d</i>
3	11.2	10	4.58	2	3.19	1	2.45
6	10.0	2	4.46	1	3.03	2	2.390
4	9.1	2	4.24	1	2.96	1	2.335
3	6.72	1	4.14	1	2.88	1	2.270
7	5.87	5	4.07	2	2.81	1	2.160
4	5.50	8	3.92	1	2.73	1	1.965
3	5.06	1	3.74	1	2.70		
4	4.95	3	3.61	3	2.61		
3	4.68	2	3.37	1	2.53		

Table 10
L-Sorbitose derivative (with H₂O)

<i>I</i>	<i>d</i>	<i>I</i>	<i>d</i>	<i>I</i>	<i>d</i>	<i>I</i>	<i>d</i>
2	18.1	1	4.21	4	2.65	1	2.060
3	9.0	1	4.13	2	2.59	1	1.990
3	7.10	3	4.01	2	2.57	1	1.960
5	6.19	6	3.80	2	2.54	1	1.905
3	5.95	4	3.61	2	2.48	1	1.880
8	5.63	1	3.47	3	2.420	1	1.835
1	5.43	5	3.37	2	2.390	1	1.815
3	5.17	2	3.17	1	2.325	1	1.730
5	4.81	3	3.05	1	2.280	1	1.675
1	4.60	4	2.96	2	2.225	1	1.660
10	4.47	3	2.89	2	2.140	1	1.635
9	4.35	4	2.82	1	2.080		

Table 11
L-Sorbitose derivative (with C₂H₅OH)

<i>I</i>	<i>d</i>	<i>I</i>	<i>d</i>	<i>I</i>	<i>d</i>	<i>I</i>	<i>d</i>
5	17.7	8	4.20	2	2.94	1	2.210
3	8.7	1	4.07	3	2.89	1	2.155
9	7.45	2	3.89	3	2.81	2	1.970
1	6.01	8	3.78	3	2.72	1	1.945
3	5.82	1	3.70	2	2.67	1	1.865
1	5.70	1	3.62	2	2.58	1	1.805
1	5.59	1	3.55	3	2.52	1	1.780
4	4.88	7	3.37	3	2.425		
10	4.67	4	3.18	2	2.350		
1	4.41	1	2.98	3	2.250		

Strongest lines in diffraction patterns of thiobenzohydrazides

Table 12

1st Line	2nd Line	3rd Line	Thiobenzohydrazide of
5.78	15.4	4.85	<i>L</i> -Rhamnose
5.75	4.65	4.30	<i>D</i> -Lyxose
4.97	4.40	3.57	<i>D</i> , <i>L</i> -Arabinose
4.67	7.45	4.20	<i>L</i> -Sorbose ¹
4.66	3.53	15.1	<i>D</i> -Mannose
4.58	3.92	5.87	<i>D</i> -Fructose
4.50	14.8	2.325	<i>D</i> -Glucose
4.47	4.35	5.63	<i>L</i> -Sorbose ²
4.42	4.31	7.7	<i>D</i> -Galactose
4.20	4.55	4.61	<i>D</i> -Arabinose
4.19	5.06	13.4	<i>D</i> -Xylose
3.93	12.0	4.74	<i>D</i> -Ribose

4. Mixtures of thiobenzohydrazides

The patterns of some two-component systems are reproduced in Figs. 2–6. In all the cases investigated the pattern of one component in the mixtures is merely superimposed on that of the other, i. e. no solid solutions are formed. It is scarcely possible to detect or qualitatively determine the minor component if it is present in a smaller proportion than about 20 per cent and for this

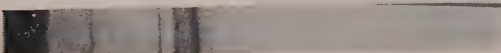
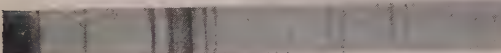
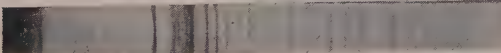
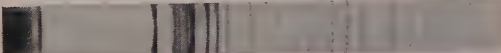
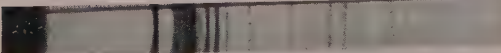
	% Xylose	M.p., °C	Page (1)
	0	163–165	150
	18	153–156	150
	42	140–146	150 ³
	64	113–115	150
	84	113–116	150
	93	115–117	150
	100	116–118	150

Fig. 2. Powder patterns of mixtures of thiobenzohydrazides of *L*-arabinose and *D*-xylose.

¹ With C₂H₅OH.

² With H₂O.

³ Page 150 note, with *D*-arabinose.

A. JOHANSSON, *X-ray identification of sugar thiobenzohydrazides*

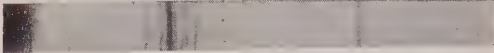
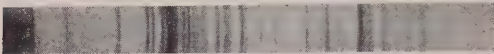
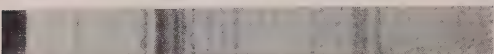
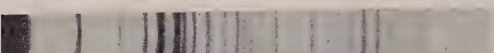
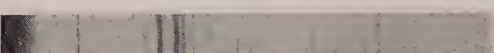
	% Arabinose	M.p., °C	Page (1)
	0	178-180	154
	15	176-178	153-154
	23	160-163	—
	50	150-153	154
	86	154-156	154
	100	163-165	154

Fig. 3. Powder patterns of mixtures of thiobenzohydrazides of *L*-arabinose and *D*-glucose.

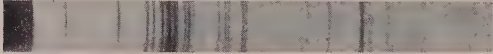
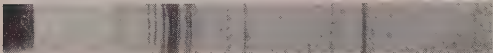
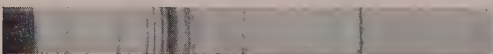
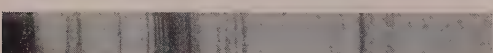
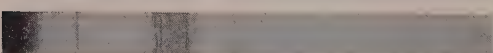
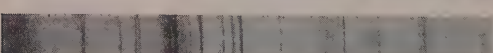
	% Galactose	M.p., °C	Page (1)
	0	178-180	158
	15	179-181	157
	19	179-181	—
	29	168-170	158
	52	154-157	158
	68	150-152	158
	100	180-181 ⁰¹	61

Fig 4. Powder patterns of mixtures of thiobenzohydrazides of *D*-glucose and *D*-galactose.

reason a quantitative determination would be very inaccurate. On the other hand this fact makes it unnecessary to have extremely pure specimens for the identification of a sugar, since the pattern retains its characteristic appearance even if the sugar concerned is contaminated by small amounts of another.

In tables 13-17 the three strongest lines of each mixture are listed.

¹ The specimen of m.p. 171-173° (page 158 in (1)) gave unsatisfactory patterns.

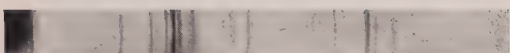
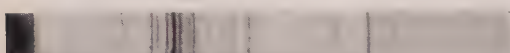
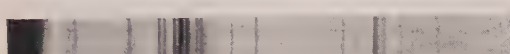
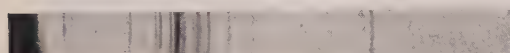
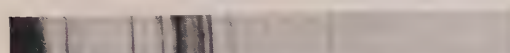
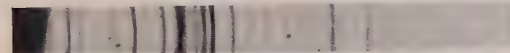
	% Fructose	M.p., °C	Page (1)
	0	181-183	160
	4	172-174	160
	11	170-172	160
	25	165-167	—
	50	163-165	160
	76	160-162	160
	81	164-166	160
	100	171-172	160

Fig. 5. Powder patterns of mixtures of thiobenzohydrazides of *D*-glucose and *D*-fructose.

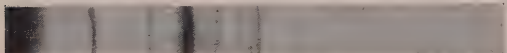
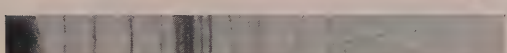
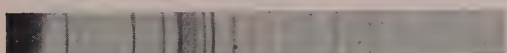
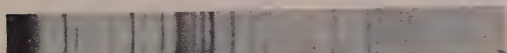
	% Fructose	M.p., °C	Page (1)
	0	172-174	162
	6	170-172	162
	50	162-164	162
	76	162-164	162
	86.5	164-166	162
	100	171-172	162

Fig. 6. Powder patterns of mixtures of thiobenzohydrazides of *D*-galactose and *D*-fructose.

X-ray diffraction data for mixtures of thiobenzohydrazides

Table 13

Mixtures of thiobenzohydrazides of *L*-arabinose and *D*-xylose

% Arabinose	% Xylose	1st Line	2nd Line	3rd Line
100	0	4.20	4.55	4.61
82	18	4.21	4.56	4.61
58	42	4.17	4.56	5.06
36	64	4.18	5.07	4.56
16	84	4.17	5.00	13.4
7	93	4.15	5.00	13.0
0	100	4.19	5.06	13.4

Table 14

Mixtures of thiobenzohydrazides of *L*-arabinose and *D*-glucose

% Arabinose	% Glucose	1st Line	2nd Line	3rd Line
0	100	4.50	14.8	2.325
15	85	4.51	14.8	2.325
23	77	4.52	14.8	2.325
50	50	4.21	4.58	14.8
86	14	4.21	4.57	4.61
100	0	4.20	4.55	4.61

Table 15

Mixtures of thiobenzohydrazides of *D*-glucose and *D*-galactose

% Glucose	% Galactose	1st Line	2nd Line	3rd Line
100	0	4.50	14.8	2.325
85	15	4.50	14.8	2.325
81	19	4.48	14.8	2.335
71	29	4.52	14.8	2.335
48	52	4.52	14.8	2.330
32	68	4.82	4.14	8.4
0	100	4.42	4.31	7.7

Table 16

Mixtures of thiobenzohydrazides of *D*-glucose and *D*-fructose

% Glucose	% Fructose	1st Line	2nd Line	3rd Line
100	0	4.50	14.8	2.325
96	4	4.50	14.8	2.335
89	11	4.50	14.8	2.335
75	25	4.52	14.8	2.325
50	50	4.52	3.96	14.8
24	76	4.55	3.92	5.86
19	81	4.58	3.92	5.86
0	100	4.58	3.92	5.87

Table 17

Mixtures of thiobenzohydrazides of *D*-galactose and *D*-fructose

% Galactose	% Fructose	1st Line	2nd Line	3rd Line
100	0	4.42	4.31	7.7
94	6	4.41	4.25	7.6
50	50	4.40	4.25	4.56
24	76	4.54	3.89	5.85
13.5	86.5	4.52	3.87	5.81
0	100	4.58	3.92	5.87

5. Polyhydroxyalkyl-phenyl-thiodiazoles

Patterns and data of the polyhydroxyalkyl-phenyl-thiodiazoles are given in Fig. 7 and tables 18–28. In this case the derivatives of *D*, *L*-arabinose and the *D*- or *L*-form are identical, and the *D*, *L*-form must therefore be a conglomerate of the active forms.

X-ray diffraction data for polyhydroxyalkyl-phenyl-thiodiazoles

Table 18

D-Ribose derivative

<i>I</i>	<i>d</i>	<i>I</i>	<i>d</i>	<i>I</i>	<i>d</i>	<i>I</i>	<i>d</i>
8	11.6	1	4.24	4	3.20	1	2.230
1	7.7	4	4.14	2	3.04	1	2.175
2	5.56	1	3.85	4	2.98	1	2.135
7	5.34	5	3.74	3	2.75	1	2.080
1	4.85	2	3.56	2	2.66	1	2.045
6	4.76	2	3.57	2	2.51	1	1.985
4	4.49	10	3.50	1	2.90	1	1.885

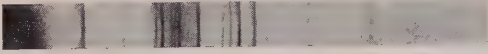
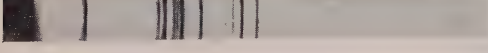
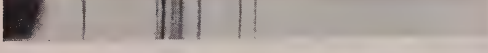
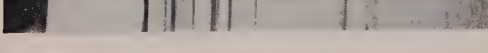
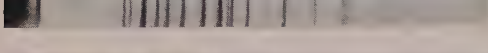
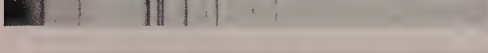
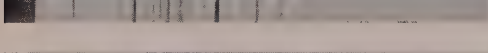
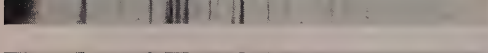
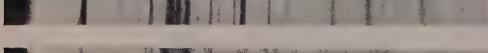
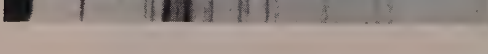
	Thiodiazole of	M.p., ° C	Page (1)
	<i>D</i> -Ribose	166-167	76
	<i>D</i> -Ribose (from Arabinose)	166-167	72
	<i>D</i> -Arabinose	212-214	68
	<i>L</i> -Arabinose	213-214	68
	<i>D, L</i> -Arabinose	195-197	68
	<i>D</i> -Xylose	149-151	74
	<i>D</i> -Lyxose	141-143	75
	<i>L</i> -Rhamnose	186-187	76
	<i>D</i> -Altrose (from Sedoheptose)	212-213	82
	<i>D</i> -Glucose	196-198	77
	<i>D</i> -Talose (from Galactose)	177-179	80
	<i>D</i> -Mannose	205-207	79
	<i>D</i> -Mannose (from Glucose)	205-207	78
	<i>D</i> -Galactose	222-224	79

Fig. 7. Powder patterns of polyhydroxyalkyl-phenyl-thiodiazoles

Table 19

L-Arabinose derivative

<i>I</i>	<i>d</i>	<i>I</i>	<i>d</i>	<i>I</i>	<i>d</i>	<i>I</i>	<i>d</i>
5	14.8	5	3.50	3	2.63	1	2.015
9	7.8	5	3.40	2	2.57	1	1.995
3	7.3	1	3.34	2	2.48	1	1.960
3	5.73	9	3.30	1	2.41	1	1.930
1	4.90	2	3.16	2	2.45	1	1.875
5	4.75	8	3.12	1	2.280	1	1.860
10	4.59	1	3.03	2	2.240	1	1.840
3	4.38	1	2.99	2	2.225	1	1.820
3	4.31	3	2.94	1	2.195	1	1.775
8	4.21	2	2.87	1	2.135	1	1.740
8	3.87	2	2.81	2	2.100	1	1.705
1	3.79	1	2.79	2	2.060	1	1.655
1	3.66	3	2.75	2	2.025		

Table 20

D-Xylose derivative

<i>I</i>	<i>d</i>	<i>I</i>	<i>d</i>	<i>I</i>	<i>d</i>	<i>I</i>	<i>d</i>
8	11.6	4	4.13	5	3.21	4	2.375
2	5.5	6	3.94	6	3.11	1	2.325
2	5.25	5	3.65	3	2.99	2	2.260
10	5.02	4	3.61	2	2.90	2	2.215
4	4.76	4	3.56	2	2.78	1	1.775
2	4.63	2	3.49	3	2.73	1	1.705
5	4.50	6	3.41	2	2.67		
7	4.34	5	3.32	2	2.405		

Table 21

D-Lyxose derivative

<i>I</i>	<i>d</i>	<i>I</i>	<i>d</i>	<i>I</i>	<i>d</i>	<i>I</i>	<i>d</i>
2	14.0	8	4.61	4	3.87	1	3.23
2	13.0	1	4.55	2	3.81	1	2.79
5	8.9	7	4.44	2	3.68	1	2.70
5	7.7	2	4.36	1	3.65	1	2.57
2	6.67	1	4.26	2	3.55	1	2.45
2	6.43	10	4.09	2	3.47		
5	4.75	3	4.03	1	3.34		

Table 22

L-Rhamnose derivative

<i>I</i>	<i>d</i>	<i>I</i>	<i>d</i>	<i>I</i>	<i>d</i>	<i>I</i>	<i>d</i>
5	20.0	4	3.72	4	2.62	1	2.015
8	15.2	2	3.62	2	2.52	1	1.935
5	7.61	1	3.52	4	2.47	1	1.895
5	5.12	1	3.30	2	2.390	1	1.615
8	4.61	6	3.23	1	2.295		
10	4.45	4	3.06	1	2.260		
7	4.35	1	2.88	1	2.225		
9	4.08	1	2.78	1	2.185		
4	3.85	1	2.69	1	2.145		

Table 23

D-Altrose derivative

<i>I</i>	<i>d</i>	<i>I</i>	<i>d</i>	<i>I</i>	<i>d</i>	<i>I</i>	<i>d</i>
7	12.5	7	4.14	4	3.02	2	2.160
4	8.3	2	3.86	7	2.86	1	2.110
5	5.66	8	3.81	2	2.64	1	2.070
5	5.45	2	3.64	5	2.61	1	2.040
2	5.26	8	3.55	2	2.51	1	1.970
10	5.07	3	3.45	3	2.430	1	1.940
2	4.82	7	3.40	3	2.400	2	1.900
7	4.68	2	3.31	2	2.325	2	1.825
1	4.56	6	3.22	2	2.240	2	1.775
7	4.45	2	3.12	2	2.210	2	1.700

Table 24

D-Glucose derivative

<i>I</i>	<i>d</i>	<i>I</i>	<i>d</i>	<i>I</i>	<i>d</i>	<i>I</i>	<i>d</i>
8	11.7	8	4.56	5	3.14	2	2.46
3	8.1	2	4.25	5	2.91	1	2.405
2	5.44	7	4.06	1	2.83	1	2.375
2	5.24	4	3.81	1	2.77	2	2.250
2	5.06	5	3.73	1	2.71	2	2.155
10	4.92	8	3.57	1	2.63		
7	4.64	5	3.35	1	2.53		

Table 25

D-Talose derivative

<i>I</i>	<i>d</i>	<i>I</i>	<i>d</i>	<i>I</i>	<i>d</i>	<i>I</i>	<i>d</i>
8	13.6	3	4.19	1	3.05	1	2.365
4	8.4	2	4.03	4	2.87	1	2.330
4	6.77	3	3.79	1	2.82	1	2.300
3	5.70	10	3.59	3	2.66	1	2.245
8	5.33	1	3.44	3	2.60	1	2.215
3	4.97	2	3.38	3	2.52	1	2.175
3	4.80	1	3.23	1	2.47	1	2.145
3	4.60	2	3.18	1	2.45	1	2.110
4	4.36	5	3.09	1	2.410	1	1.930

Table 26

D-Mannose derivative

<i>I</i>	<i>d</i>	<i>I</i>	<i>d</i>	<i>I</i>	<i>d</i>	<i>I</i>	<i>d</i>
8	7.69	2	3.94	2	2.83	1	2.130
3	5.90	2	3.86	2	2.76	1	2.095
2	5.27	4	3.71	2	2.71	3	2.030
5	4.90	3	3.61	2	2.57	2	1.970
2	4.76	3	3.38	4	2.49	2	1.880
2	4.51	8	3.29	1	2.420	2	1.870
10	4.44	2	3.21	1	2.370	1	1.755
6	4.32	2	3.07	3	2.280	1	1.725
6	4.27	4	3.01	1	2.215	1	1.645
9	4.10	1	2.86	1	2.160		

Table 27

D-Galactose derivative

<i>I</i>	<i>d</i>	<i>I</i>	<i>d</i>	<i>I</i>	<i>d</i>	<i>I</i>	<i>d</i>
2	12.9	9	4.14	4	3.35	1	2.49
7	7.41	1	3.89	4	3.25	1	2.440
2	5.94	1	3.82	4	3.04	1	2.400
4	5.12	4	3.73	2	2.97	2	2.255
4	4.89	1	3.58	2	2.79	2	2.190
10	4.56	1	3.53	1	2.67	1	2.060
3	4.32	1	3.45	2	2.58	2	2.000

Strongest lines in diffraction patterns of polyhydroxyalkyl-phenyl-thiodiazoles

Table 28

1st Line	2nd Line	3rd Line	Thiodiazole of
5.07	3.81	3.55	<i>D</i> -Altrose
5.02	11.6	4.34	<i>D</i> -Xylose
4.92	11.7	4.56	<i>D</i> -Glucose
4.59	7.8	3.30	<i>L</i> -Arabinose
4.56	4.14	7.41	<i>D</i> -Galactose
4.45	4.08	15.2	<i>L</i> -Rhamnose
4.44	4.10	7.69	<i>D</i> -Mannose
4.09	4.61	4.44	<i>D</i> -Lyxose
3.57	13.6	5.33	<i>D</i> -Talose
3.43	11.6	5.24	<i>D</i> -Ribose

Acknowledgment

The author is indebted to Docent A. MAGNÉLI, Uppsala, for recording the X-ray patterns.

LITERATURE CITED. 1. B. Holmberg, Arkiv för kemi, 4, nr. 5 (1952). — 2. A. Guinier, Compt. rend., 204, 115 (1937). — 3. G. Hägg, Rev. Sci. Instruments, 18, 371 (1947).

Tryckt den 5 april 1952

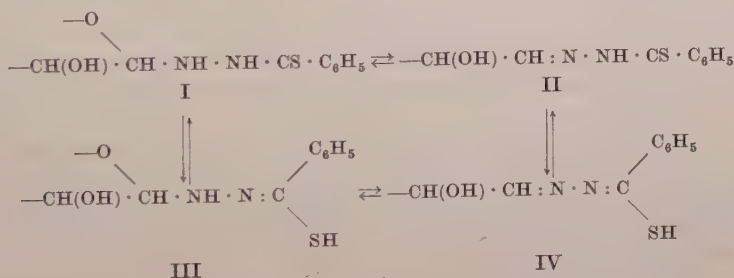
Uppsala 1952. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

Über Thiobenzhydrazide einfacher Zuckerarten

Von BROR HOLMBERG

I. Einleitung und Übersicht

Bei Umsetzungen einfacher Zuckerarten in verdünnt alkoholischen, salzsauren oder alkalischen Lösungen mit dem vom Verf. vor einigen Jahren (1 und 2) beschriebenen Thiobenzhydrazid entstehen unter Austritt von Wasser meistens kristallinische¹, in Wasser und Alkohol schwerlösliche Verbindungen, welche im Gegensatz zu den von WUYTS (3) aus Aldosen und dem 1-Phenyl-2-thiobenzoylhydrazin erhaltenen Glykothiodiazolinen immer noch so viele von den Reaktionsmöglichkeiten ihrer Komponenten aufweisen, dass sie im folgenden als *Zucker-thiobenzhydrazide* benannt werden. Gemäss dieser Benennung enthalten z. B. die Aldose-thiobenzhydrazide die Gruppierung (I), aber die Formulierung als wirkliche Hydrazone (II) erscheint auch möglich, und bei ihren Umsetzungen ist auch Rücksicht auf die Möglichkeit zur Bildung von Derivaten der Isothioformen (III bzw. IV) zu nehmen.



In jedem speziellen Fall wird diejenige Ausgangsformel benutzt, welche die einfachste Formulierung der betreffenden Umsetzung erlaubt, und von den übrigen, strukturellen oder sterischen, Komplikationen wird im allgemeinen abgesehen, da das Hauptziel der vorliegenden Untersuchung gewesen ist, festzustellen, inwieweit es möglich ist, mit Hilfe des Thiobenzhydrazids zu einer Diagnostizierung und vielleicht auch zu einer wenigstens qualitativen Separierung einfacher Zuckerarten kommen zu können.

Auch mit den gemachten Einschränkungen hat man offenbar bei den Zucker-thiobenzhydraziden ein vielseitiges Reaktionsvermögen zu erwarten, was die Unter-

¹ Das Thiobenzhydrazid der Sedoheptose ist jedoch nur als ein in Wasser leichtlösliches Glas erhalten worden, und ähnliche Produkte wurden bei Umsetzungen des Thiobenzhydrazids mit Maltose, Cellobiose und Lactose erhalten.

suchung auch vielfach bestätigt hat. Am ausführlichsten wurde in dieser Hinsicht das *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid bearbeitet, und insofern hierbei Resultate von allgemeinerem Interesse erzielt wurden und der Zugang an Materialien es erlaubt hat, wurden danach ähnliche Versuche auch mit den entsprechenden Derivaten der anderen Zucker angestellt.

Inwieweit die Schmelzpunkte und die optischen Drehungen der Zucker-thiobenzhydrazide zur Charakterisierung und Diagnostizierung dieser Verbindungen und der ihnen entsprechenden Zuckerarten verwendbar sind, geht aus der Zusammenstellung der Tabelle 1 hervor.

Tabelle 1.

Thiobenzhydrazid der	Schmp. ¹	In Pyridin ²		In Natronlauge ³	
		$[\alpha]_D^{20}$	$[M]_D^{20}$	$[\alpha]_D^{20}$	$[M]_D^{20}$
<i>d</i> (-)-Arabinose	167°—168°	+ 37°,3	+ 106°,1	- 49°,5	- 140°,7
<i>l</i> (+)-Arabinose	167°—168°	- 37°,2	- 105°,8	+ 49°,3	+ 140°,2
<i>d, l</i> -Arabinose	161°—162°	—	—	—	—
<i>d</i> (+)-Xylose	117°—118°	- 44°,6	- 126°,8	+ 23°,6	+ 67°,1
<i>d</i> (-)-Lyxose	170°—171°	+ 18°,8	+ 53°,4	+ 11°,7	+ 33°,3
<i>d</i> (-)-Ribose	140°—141°	- 26°,4	- 75°,1	- 4°,5	- 12°,8
<i>l</i> (+)-Rhamnose	175°—176°	- 10°,9	- 32°,5	- 10°,2	- 30°,4
<i>d</i> (+)-Glucose	183°—184°	- 42°,0	- 132°,0	+ 19°,2	+ 60°,4
<i>d</i> (+)-Mannose	192°—193°	+ 16°,2	+ 50°,9	+ 19°,9	+ 62°,6
<i>d</i> (+)-Galaktose	180°—181°	- 40°,2	- 126°,4	+ 31°,0	+ 97°,4
<i>d</i> (-)-Fructose	175°—176°	+ 24°,2	+ 76°,1	- 45°,4	- 142°,7
<i>l</i> (-)-Sorbose	68°—72° ⁴	+ 8°,1	+ 25°,5	- 41°,3	- 129°,8
<i>d</i> (+)-Sedoheptose	(60°—85°) ⁵	+ 15°,0	+ 51°,7	- 5°,0	- 17°,2

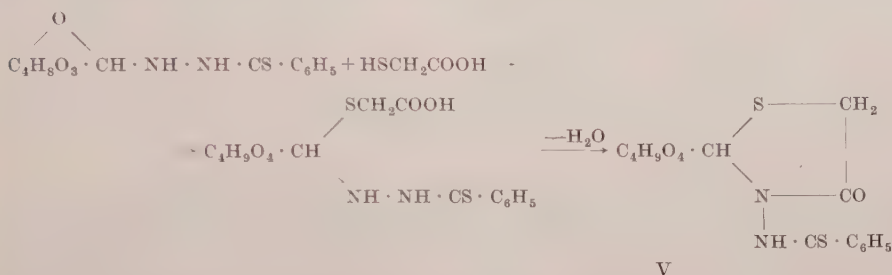
Betreffs der chemischen Eigenschaften der Zucker-thiobenzhydrazide ist zuerst zu bemerken, dass diese Verbindungen nicht ohne weiteres mit Lösungsmitteln erwärmt werden können, da sie dabei oft in klebrige, undefinierbare Massen übergehen. — Gegen *Mineralsäuren* verhalten sie sich bei gewöhnlicher Temperatur (mit Ausnahme für das Xylose-thiobenzhydrazid) indifferent, während sie gemäss den Formeln III und IV von *Laugen* leicht gelöst werden und sogar gegen Phenolphthalein beinahe quantitativ damit titriert werden können. Hierbei treten deutlich zeitliche Neutralisationsphänomene auf, und aus den momentanen Verbräuchen an Lauge ergeben sich für die Thiobenzhydrazide der unten angeführten Zucker die angegebenen, ungefähren prozentualen Gehalte an Isothioformen in 50 %-igem Alkohol:

Arabinose.....18	Ribose.....36	Mannose.....68 ⁶
Xylose.....14	Rhamnose.....21	Galaktose.....35
Lyxose.....17	Glucose.....43	Fructose.....73

¹ Zersetzung.² Für $c = 2$ (g/100 ml) bei dem Mannose-thiobenzhydrazid und $c = 5$ bei den übrigen. Keine Mutarotation.³ Für $c = 5$ in 10 Proz. überschüssiger Lauge und Endwerte nach mehr oder weniger stark ausgeprägter Mutarotation.⁴ Mit 1 Mol. Kristallalkohol.⁵ Glas.⁶ In gelinder Wärme.

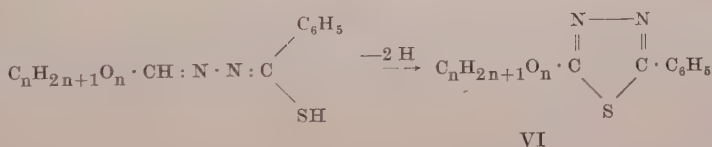
Die Lösungen der Zucker-thiobenzhydrazide in Natronlauge geben mit Lösungen von Schwermetallsalzen im allgemeinen käsige oder pulverförmige, gefärbte und veränderliche Fällungen, von denen jedoch die aus dem Glucose-thiobenzhydrazid mit Nickelsulfat erhaltliche kristallinisch ist.

Beim Zusammenreiben des *l*-Arabinose-thiobenzhydrazids mit Thioglykolsäure in 2-n. Salzsäure entstand gemäss dem Schema



das durch Anhydrierung einer primär gebildeten Thiobenzoylhydrazino-*l*-arabinose-thioglykolsäure entstandene 2-*l*-Arabinotetraoxybutyl-3-thiobenzoylamino-4-oxo-1,3-thiazolidin (V), welches nach der Umkristallisierung aus Alkohol bei 149°—152° schmolz und in 50%-igem Alkohol $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -227^\circ$ zeigte.

Von Oxydationsmitteln werden die Zucker-thiobenzhydrazide leicht angegriffen. Mit Wasserstoffsuperoxyd geben sie hierbei hauptsächlich komplizierte Produkte, aus denen nur die Isolierung des auch aus dem Thiobenzhydrazid selber in der gleichen Weise (2) erhältlichen 2,5-Diphenyl-1,3,4-thiodiazols gelungen ist. Mit Eisenchlorid, Kaliumpersulfat, Benzolsulfonchloramidnatrium oder Pyridiniumtribromid, oder in einigen Fällen sogar durch Autoxydation an der Luft, geben dagegen die Aldose-thiobenzhydrazide in mehr oder weniger guten Ausbeuten und analog dem Benzaldehyd-thiobenzhydrazon (2) 5-Polyoxyalkyl-2-phenyl-1,3,4-thiodiazole (VI) gemäss dem Schema:¹



Bei der Oxydation eines Ketose-thiobenzhydrazids wird die Kohlenstoffkette gesprengt; aus dem *d*-Fructose-thiobenzhydrazid entstehen dabei die dem Glykolaldehyd ($n = 1$ in der Formel VI) und der *d*-Arabinose entsprechenden Thiodiazole, während aus dem *l*-Sorbose-thiobenzhydrazid nur die Glykolo-Verbindung entsteht und bei dem *d*-Sedoheptose-thiobenzhydrazid eine Verbindung erhalten wird, welche gemäss der Konfiguration der *d*-Sedoheptose als 5-*d*-Altropentaoxyamyl-2-phenyl-1,3,4-thiodiazol aufzufassen ist. Was aus den übrigen Teilen der Zuckerreste gebildet wird, muss vorläufig unentschieden gelassen werden.

¹ Gemäss YOUNG und EYRE (4) entsteht auch beim Oxydieren des Benzaldehyd-thiosemicarbazons mit Eisenchlorid ein Thiodiazol; FROMM (5) hat freilich vermutet, dass hierbei ein Mercaptotriazol gebildet wird, aber gemäss HOGGARTH (6) ist diese Auffassung nicht richtig.

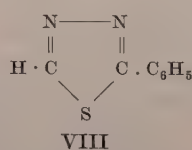
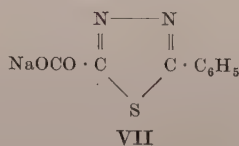
Gegen chemische Angriffe sind die Polyoxyalkyl-phenylthiodiazole sehr resistent. Besonders in der Wärme zeigen sie indessen eine gewisse Löslichkeit in Natronlauge und als Abkömmlinge von Aldonsäuren unterliegen sie beim Erhitzen damit einer teilweisen Epimerisierung. In dieser Weise wurden aus dem *l*-Arabino-thiodiazol die entsprechende *l*-Ribo-Verbindung und aus dem *d*-Ribo-thiodiazol die *d*-Arabino-Verbindung erhalten. Ferner wurden aus dem *d*-Xylo-thiodiazol die *d*-Lyxo-Verbindung und aus dem *d*-Gluco-thiodiazol die *d*-Manno-Verbindung gebildet, und aus dem Galakto-thiodiazol entstand eine Isomere, welche als 5-*d*-Talopentaoxyamyl-2-phenyl-1,3,4-thiodiazol aufzufassen ist.

Die für die erhaltenen Polyoxyalkyl-phenylthiodiazole gefundenen Schmelzpunkte (Zersetzung) und Drehungsvermögen in Pyridin (ohne Mutarotation) sind aus der Tabelle 2 ersichtlich.

Tabelle 2.

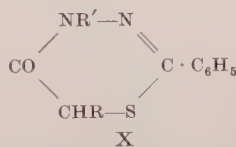
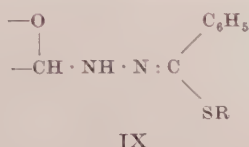
Thiodiazolderivat der	Schmp.	c	In Pyridin	
			$[\alpha]_D^{20}$	$[M]_D^{20}$
<i>d</i> -Arabinose	212°—214°	4	−24°,4	−68°,9
<i>l</i> -Arabinose	213°—214°	2	+26°,4	+74°,5
»	—	4	+24°,4	+68°,9
<i>d</i> , <i>l</i> -Arabinose	195°—197°	—	—	—
<i>d</i> -Xylose	150°—151°,5	5	+7°,1	+20°,0
<i>d</i> -Lyxose	141°—143°	3	−16°,7	−47°,1
<i>d</i> -Ribose	166°—167°	4	+17°,6	+49°,7
<i>l</i> -Rhamnose	186°—187°	4	+26°,6	+78°,8
<i>d</i> -Altrose	212°—213°	2,5	−11°,3	−35°,3
<i>d</i> -Glucose	196°—198°	4	−4°,9	−15°,3
<i>d</i> -Mannose	206°—207°	4	−13°,2	−41°,2
<i>d</i> -Galaktose	222°—224°	1	+15°,1	+47°,2
<i>d</i> -Talose	177°—179°	5	−13°,8	−43°,1

Von Bromlauge wird indessen das *l*-Arabino-phenylthiodiazol angegriffen und als fassbares Reaktionsprodukt entsteht dabei das Natriumsalz der 2-Phenyl-1,3,4-thiodiazol-5-carbonsäure (VII). Die aus diesem Salz freigemachte Säure zerfällt aber schnell in Kohlendioxyd und 2-Phenyl-1,3,4-thiodiazol (VIII), welches bei 40°–41° schmilzt.



Gemäss der Formel III bzw. IV ist zu erwarten, dass die Zucker-thiobenzhydrazide in alkalischen Lösungen sich mit *Haloidestern* unter Bildung von Verbindungen der Zusammensetzung IX umsetzen werden. Mit Äthylbromid wurden hierbei im allgemeinen klebrige Produkte erhalten, aber bei den *l*-Rhamnose- und *d*-Mannose-thiobenzhydraziden waren diese (IX, R = C₂H₅) kristallinisch, schmolzen bei 137°–138° bzw. 143°–144° und zeigten in abs. Alkohol (ohne Mutarotation) $[\alpha]_D^{20} = +3°,6$ bzw. +16°,8, und in Pyridin $[\alpha]_D^{20} = +1°,2$ bzw. +28°,2.

Die in der obigen Weise mit Halogenacetaten entstehenden Verbindungen (IX, $R = CH_2COONa$) zerfallen wenigstens beim Ansäuern in freien Zucker und Hydrazonobenzoyl-thioglykolsäure, welche sich sogleich zu dem früher vom Verf. (2) beschriebenen 2-Phenyl-5-oxo-5,6-dihydro-1,3,4-thiopyridazin (X, $R = R' = H$) anhydriert, und man hat somit hier eine Möglichkeit, einen Zucker aus seinem Thiobenzhydrazid zu regenerieren.



Mit *d,l*- α -Brompropionaten treten ähnliche Erscheinungen auf, aber dank einer grösseren Anhydrisierungsgeschwindigkeit der primär entstehenden Zucker-hydrazonobenzoyl-thiomilchsäuren¹ können hier auch die inneren Anhydride dieser Säuren (X, $R = CH_3$, $R' = \text{Zuckerrest}$) erfasst werden. Gleichzeitig bekommt man grössere oder kleinere Mengen des Anhydrids der Hydrazonobenzoyl-thiomilchsäure (X, $R = CH_3$, $R' = H$), und wegen verschiedener Zersetzungs- oder Anhydrisierungsgeschwindigkeiten der beiden diastereoisomeren Primärprodukte erhält man auch bei reaktionsäquivalenten Mengen des Brompropionates und des Zucker-thiobenzhydrazids die Pyridazin-Verbindungen als schwach aktive Formen. Wenn man die inaktive Brompropionsäure in Überschuss nimmt, wird auch der unverbrauchte Teil dieser Säure etwas aktiviert, was auf verschiedene Umsetzungsgeschwindigkeiten ihrer beiden Formen mit dem Zucker-thiohydrazid hinweist. So wurde z.B. in einem Fall bei dem *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid eine Brompropionsäure gewonnen, welche $[\alpha]_D^{20} = -0,29^\circ$ zeigte, was einem Überschuss von 1 % der (-)-Form entspricht; aus dieser Säure wurde ein Gemisch aus Dithiodilactylsäuren dargestellt, welches $[\alpha]_D^{20} = +3^\circ,8$ (in Wasser) zeigte und somit 0,9 % überschüssige, aktive Säure enthielt. Über die Verhältnisse bei den in dieser Hinsicht untersuchten Thiobenzhydraziden gibt die Tabelle 3, S. 38 eine Übersicht.

Mit Ausnahme des *d*-Galaktose-thiobenzhydrazids haben also sämtliche Zucker-thiobenzhydrazide mit $C_v = d$ linksdrehende 6-Methyl-2-phenyl-5-oxo-5,6-dihydro-1,3,4-thiopyridazine und umgekehrt gegeben; die Übereinstimmung zwischen den Werten der beiden Kolonnen ist gut, wenn beachtet wird, dass die entsprechenden Präparate umkristallisiert werden müssten. Ähnliche Regelmässigkeiten treten in der letzten Kolonne auf, und aus den dort mitgeteilten Drehungen geht hervor, dass mit Ausnahme der *d*-Mannose und der *d*-Sedoheptose ein $C_v = d$ einem rechtsdrehenden Dithiodilactylsäure-Gemisch, bzw. einer linksdrehenden α -Brompropionsäure, entspricht und umgekehrt, was bedeutet, dass die Zucker-thiobenzhydrazide mit $C_v = d$ im allgemeinen am schnellsten mit der (+)- α -Brompropionsäure reagieren und umgekehrt.

Bei der Umsetzung des *l*-Arabinose-thiobenzhydrazids in alkalischer Lösung mit Formaldehyd wird das Thiobenzhydrazid als Oxymethyl-methylen-Derivat der Formel (XI) oder einer Variante hiervon abgespalten und die Zuckerkomponente freigemacht. Ähnlich verläuft die Reaktion bei den anderen Zucker-thiobenzhydraziden, obgleich nicht immer das genannte Derivat des Thiobenzhydrazids, sondern u. a. ein als Methylen-bis-methylen-thiobenzhydrazid (XII) bezeichnetes

¹ Bei der Mannose konnte diese Säure in einigermaßen reinem Zustand gewonnen werden.

² Siehe S. 85—86.

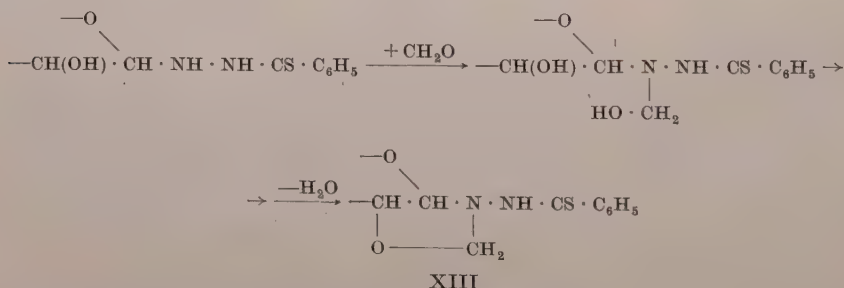
Tabelle 3.

Zuckerkomponente	C_v^1	$[\alpha]_D^{20}$ des Thiopyridaz. ²		$[\alpha]_D^{20}$ der Di-thiodilactyl-säuren ⁴
		$n=1^3$	$n=2$	
<i>d</i> -Arabinose.....	<i>l</i>	+ 4°,4	+ 4°,9	— 4°,9
<i>d</i> -Xylose.....	<i>d</i>	— 8°,7	— 10°,7	+ 7°,7
<i>l</i> -Rhamnose.....	<i>d</i>	— 1°,5	— 3°,1	+ 0°,3
<i>d</i> -Glucose.....	<i>d</i>	— 1°,8	— 4°,0	+ 4°,7
<i>d</i> -Mannose.....	<i>l</i>	+ 1°,4	+ 2°,0	+ 1°,4
<i>d</i> -Galaktose.....	<i>d</i>	+ 5°,9	+ 4°,0	+ 4°,6
<i>d</i> -Fructose.....	<i>l</i>	± 0°,0	+ 4°,4	— 10°,1
<i>d</i> -Sedoheptose.....	<i>l</i>	—	+ 0°,9	+ 0°,5

(2) Umwandlungsprodukt davon abgeschieden wird, und man hat also hier eine zweite Möglichkeit einen Zucker aus seinem Thiobenzhydrazid zurückzugewinnen.



Wenn andererseits die Umsetzungen der Zucker-thiobenzhydrazide mit dem Formaldehyd in 50 %-igem Alkohol vorgenommen werden, erhält man in deutlich mehrstufigen Verläufen als Zucker-methylen-thiobenzhydrazide (XIII)⁵ benannte Verbindungen, deren Bildung durch das folgende Schema veranschaulicht werden kann:



Die Schmelzpunkte und Drehungen der erhaltenen Zucker-methylthiobenzhydrazide gehen aus der Tabelle 4 hervor.

Bei Umsetzungen der *l*-Arabinose- und *d*-Xylose-thiobenzhydrazide mit überschüssigem Formaldehyd in Wasser-Alkohol werden Oxymethyl-methylen-thio-

¹ Bedeutet die Konfiguration des asymmetrischen, dem Carbonylkohlenstoff benachbarten Kohlenstoffatoms.

² In abs. Alcohol.

³ n = das Verhältnis zwischen Brompropionat und Zucker-thiobenzhydrazid-Natrium.

⁴ In Wasser; $n = 2$.

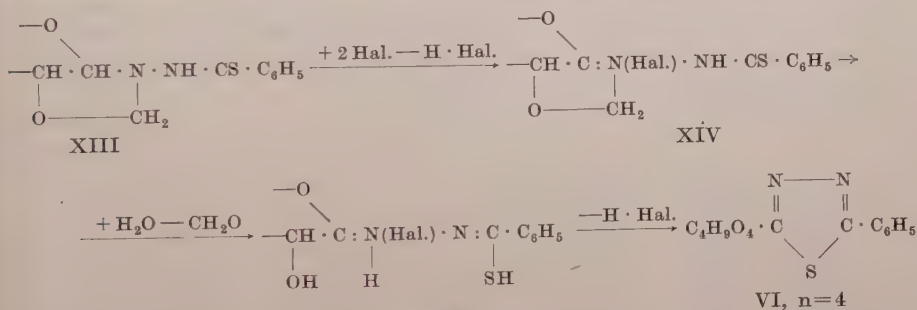
⁵ Da diese Formel den chemischen Eigenschaften der Verbindungen nicht ganz entspricht, wird sie nur mit Vorbehalt angeführt.

Tabelle 4.

Methylen-thiobenz- hydrazid von	Schmp.	In Pyridin		Ungefähre Halbie- rungs- zeit, Min.
		<i>c</i>	$[\alpha]_D^{20}$	
<i>l</i> -Arabinose	65° — 85° ¹	5	+ 110° → + 104°	110
<i>d</i> -Xylose	63° — 85° ¹	»	+ 30° → — 37°	280
<i>d</i> -Lyxose	206° — 208°	»	+ 158°,5	—
<i>d</i> -Ribose	50° — 65° ¹	»	— 209°	—
<i>l</i> -Rhamnose	209° — 211°	»	— 166°	—
<i>d</i> -Glucose	188° — 189°	2,5	— 165°	—
<i>d</i> -Mannose	173° — 174°	»	+ 156°	—
<i>d</i> -Galaktose	149° — 150°	»	+ 161° → + 150°	50
<i>d</i> -Fructose	173° — 174°	5	— 103°	—
<i>l</i> -Sorbitose	66° — 90° ¹	»	— 111° → — 130°	30
<i>d</i> -Sedoheptose	75° — 105° ¹	»	— 82° → — 92°	20

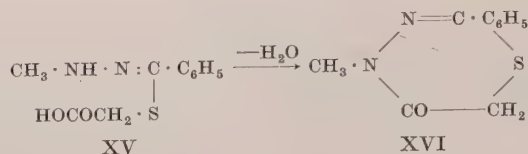
benzhydrazide erhalten, welche den entsprechenden Methylen-Verbindungen sowohl physikalisch wie chemisch sehr ähnlich sind.

Wenn das *l*-Arabinose-methylthiobenzhydrazid mit Eisenchlorid oder mit Pyridiniumtribromid oxydiert wird, entsteht das halogenwasserstoffsäure Salz eines Dehydro-arabinose-methylthiobenzhydrazids (XIV), welches beim Erhitzen in wässriger Lösung den Formaldehyd abspaltet und in das schon S. 35 (Formel VI, *n* = 4) angedeutete 5-*l*-Arabinotetraoxybutyl-2-phenyl-1,3,4-thiodiazol übergeht. Die Reaktionsserie wird daher vorschlagsweise folgendermassen formuliert:

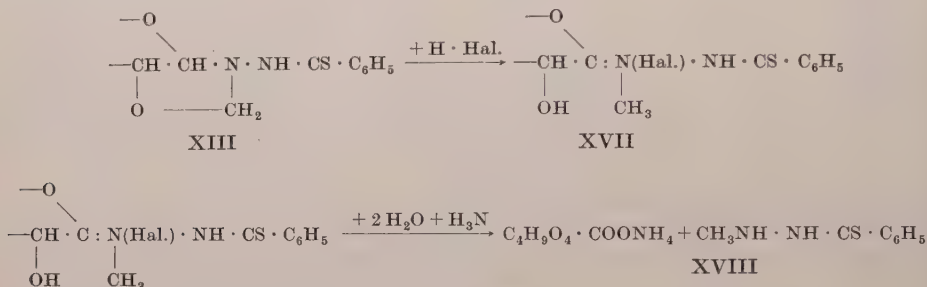


Bei der Umsetzung des *l*-Arabinose-thiobenzhydrazids mit Formaldehyd in halogenwasserstoffsaurer Lösung ebenso wie bei der Behandlung des schon fertigen *l*-Arabinose-methylthiobenzhydrazids mit einer Halogenwasserstoffsäure entsteht allmählich das Salz (XVII) einer Base derselben Zusammensetzung wie des Arabinose-methylthiobenzhydrazids selbst. Beim Behandeln eines solchen Salzes mit Ammoniak zerfällt es aber in Ammonium-*l*-arabonat und eine ölige Base, welche Salze der Zusammensetzung $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}_2\text{S} \cdot \text{Hal.}$ ergibt. Diese Base ist amphotär und setzt sich in alkalischer Lösung mit Monobromacetat zu einem Salz um, welches beim Ansäuern (XV) analog des Verhaltens des Thiobenzhydrazids selbst (2) bei den gleichen Umsetzungen eine Verbindung liefert, die demgemäss als 4-Methyl-2-phenyl-5-oxo-5,6-dihydro-1,3,4-thiopyridazin (XVI) aufgefasst wird:

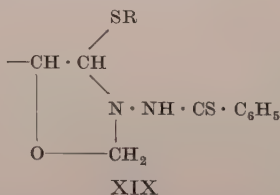
¹ Glas.



Die Base wird also als 1-Methyl-2-thiobenzoylhydrazin (XVIII) angesehen; die von der Halogenwasserstoffsäure bewirkte Umlagerung des Arabinose-methylenthio-benzhydrazids kann somit gemäss dem folgenden Schema als dismutationsartig aufgefasst werden:



Eine analoge Reaktion wurde bei dem *d*-Xylose-methylenthio-benzhydrazid konstatiert, während die Salzsäure nur die Bildung der den Thiohydraziden entsprechenden, schwerlöslichen Methylen-Derivate beschleunigte. Bei der weiteren Behandlung des *d*-Glucose-methylenthio-benzhydrazids mit Salzsäure trat jedoch eine Abspaltung des Zuckers ein und der Rest wurde als das oben erwähnte Methylen-bis-methylenthio-benzhydrazid wiedergefunden.



Aus dem *l*-Arabinose-methylenthio-benzhydrazid und *Thioessigsäure* wurde ein Thioacetat (XIX, R = COCH₃) erhalten, welches als Rohprodukt bei 146°–149° schmolz und in Pyridin $[\alpha]_D^{20} = +324^\circ \rightarrow +20^\circ,3$ und $C_M^{20} = 2,0 \times 10^{-4}$ ergab, nach Umkristallisierung aus Alkohol aber den Schmp. 149°–155°, $[\alpha]_D^{20} = -233^\circ \rightarrow +12^\circ,1$ und $C_M^{20} = 1,9 \times 10^{-4}$ zeigte. — Ähnliche Verbindungen (XIX, R = CH₂COOH) wurden aus den *l*-Arabinose- und *d*-Xylose-methylenthio-benzhydraziden und *Thioglykolsäure* gewonnen. Die hierbei erhaltene Methylenthio-benzhydrazino-*l*-arabinose-thioglykolsäure zeigte den Schmp. 131°–132° und (in Pyridin) $[\alpha]_D^{20} = +541^\circ \rightarrow -34^\circ$, $[\text{M}]_D^{20} = +2100^\circ \rightarrow -132^\circ$, und $C_M^{20} = 8,5 \times 10^{-4}$, während für das entsprechende Derivat der *d*-Xylose der Schmp. 136°–138°, $[\alpha]_D^{20} = +502^\circ \rightarrow -48^\circ$, $[\text{M}]_D^{20} = +1950^\circ \rightarrow -186^\circ$, und $C_M^{20} = 8,6 \times 10^{-4}$ gefunden wurden. — Auch eine Methylenthio-benzhydrazino-*l*-arabinosethiohydracylsäure (XIX, R = CH₂CH₂COOH)

wurde dargestellt, welche bei 112° – 115° schmolz und wie oben $[\alpha]_D^{20} = +435^{\circ} \rightarrow -47^{\circ}, 2$, $[M]_D^{20} = +1750^{\circ} \rightarrow -190^{\circ}$, und $C_M^{20} = 19 \times 10^{-4}$ zeigte.

Beim Behandeln der Methylthiobenzhydrazino-*l*-arabinose-thioglykolsäure mit Jod wurde der Mercaptosäure-Rest als Dithiodiglykolsäure abgespalten und, da also die Thioglykolsäure verhältnismässig lose an den Zucker-Rest gebunden sein dürfte, wurde nachgesehen, ob es möglich wäre, diese Säure gegen eine andere Mercaptosäure zu vertauschen. Dies gelang tatsächlich; denn beim Behandeln von 0,013 Molen der Methylthiobenzhydrazino-*l*-arabinose-thioglykolsäure mit 0,03 Molen *d,l*-Thiomilchsäure in 20 ml 1-n. Salzsäure entstand ein ungelöstes Produkt von $[\alpha]_D^{20} = -513^{\circ} \rightarrow -202^{\circ}$ (in Pyridin) und das daraus mittels Jod gewonnene Gemisch von Dithiosäuren zeigte in Wasser $[\alpha]_D^{20} = -251^{\circ}$, während das Gemisch aus bei der Umsetzung unverbrauchter Thiomilchsäure mit freigemachter Thioglykolsäure Dithiosäuren von $[\alpha]_D^{20} = +60^{\circ}$ lieferte. Bei der Umsetzung war also hauptsächlich eine Methylthiobenzhydrazino-*l*-arabinose-*l*-thiomilchsäure¹ (XIX, R = CH(CH₃)COOH) entstanden (vergl. den letzten Versuch der Tabelle 5 unten); die hierbei unverbrauchte Thiomilchsäure war rechtsdrehend geworden, was bedeutet das die *l*-Thiomilchsäure schneller als die *d*-Säure mit der Methylthiobenzhydrazino-*l*-arabinose-thioglykolsäure reagiert hat.

Die Verhältnisse bei Umsetzungen stereoisomerer Arabinose-methylthiobenzhydrazide mit ebenfalls stereoisomeren *Thiomilchsäuren* wurden danach untersucht, wobei zuerst bei Versuchen mit 0,01 Mol eines Arabinose-methylthiobenzhydrazids und *Thm* Molen einer Thiomilchsäure die in der Tabelle 5 zusammengestellten Ergebnisse erhalten wurden.

Tabelle 5.

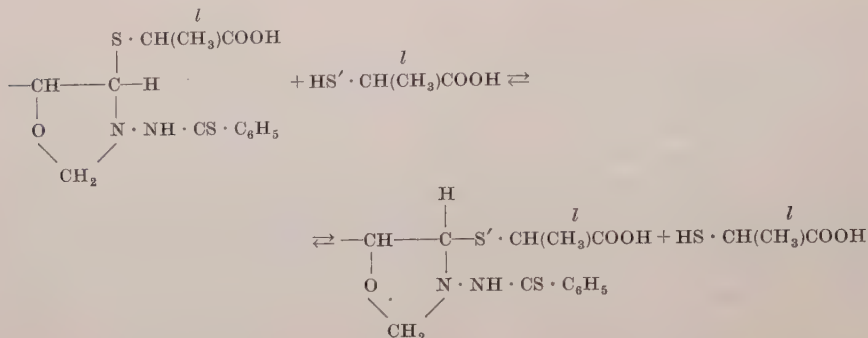
Form der		Thm.	Medium	Reaktionsprodukt			
Arab.	Thio- milchs.			g	Schmp.	$[\alpha]_D^{20}$ (Pyrid.)	$C_M^{20} \times 10^4$
<i>l</i>	<i>d, l</i>	0,01	10 ml H ₂ O	3,7	130°—139°	+ 412° → - 38°	8,2
<i>d</i>	<i>d</i>	»	» » »	3,3	149°—151°	- 231° → + 286°	8,8
<i>l</i>	<i>l</i>	»	» » »	3,4	148°—150°	+ 230° → - 265°	9,0
<i>d</i>	<i>l</i>	»	» » »	3,2	131°—132°	- 600° → - 214°	7,5
<i>l</i>	<i>d</i>	»	» » »	3,0	127°—129°	+ 527° → + 211°	7,7
<i>l</i>	<i>d</i>	0,024	5 ml 2-n. HCl	2,1	129°—132°	+ 590° → + 283°	8,0
<i>l</i>	<i>l</i>	»	» » » »	3,0	149°—151°	- 605° → - 289°	9,2

Aus diesen Versuchen geht hervor,

dass die Methylthiobenzhydrazino-*d*-arabinose-*d*-thiomilchsäure etwas weniger löslich ist, höher schmilzt und etwas schneller mutarotiert als die Methylthiobenzhydrazino-*d*-arabinose-*l*-thiomilchsäure und umgekehrt, und

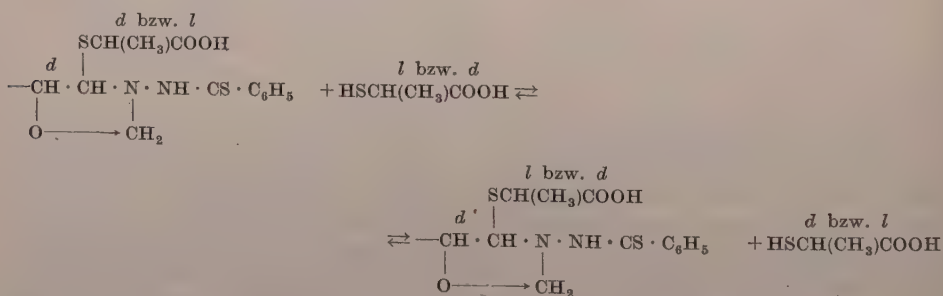
dass bei dem mit überschüssiger *l*-Thiomilchsäure in Salzsäure aus dem *l*-Arabinose-methylthiobenzhydrazid entstandenen Produkt eine wahrscheinlich beim C₁-Atom des Zuckers eingetretene Umstellung eingetroffen ist, was auf einer unter *Waldenscher* Umkehrung verlaufenden, fortgesetzten Substitution gemäss dem folgenden Schema beruhen dürfte:

¹ Gemäss FREDGA (7) werden die (+)-Thiomilchsäure und die (+)-Dithiodilactylsäure als *d*- und ihre Antipoden als *l*-Formen bezeichnet.



Aus dem Endwert des Drehungsvermögen der zuletzt erhaltenen Methylthiobenzhydrazino-*l*-arabinose-*l*-thiomilchsäure geht indessen hervor, dass in Pyridin die ursprüngliche Konfiguration des C₁-Systems wieder hergestellt wird.

Das bei dem ersten Versuch erhaltene Reaktionsprodukt ergab bei der Oxydation mit Jod ein Gemisch aus Dithiodilactylsäuren von $[\alpha]_D^{20} = -2^\circ,0$ (in Wasser), während die mit aktiven Thiomilchsäuren gewonnenen Produkte dabei solche Säuren lieferten. — Als die Methylthiobenzhydrazino-*d*-arabinose-*d*-thiomilchsäure vom Schmp. $149^\circ\text{--}151^\circ$, $[\alpha]_D^{20} = -231^\circ \rightarrow +286^\circ$ und $C_M^{20} = 8,8 \times 10^{-4}$ mit der äquivalenten Menge *l*-Thiomilchsäure in 1-n. Salzsäure geschüttelt wurde, entstand aber ein Produkt vom Schmp. $147^\circ\text{--}150^\circ$, $[\alpha]_D^{20} = -235^\circ \rightarrow +269^\circ$ und $C_M^{20} = 8,9 \times 10^{-4}$, und das daraus gewonnene Dithiodilactylsäure-Gemisch zeigte $[\alpha]_D^{20} = +374^\circ$, während die aus der Mutterlauge regenerierte Thiomilchsäure ein solches Gemisch von $[\alpha]_D^{20} = -232^\circ$ ergab. — In ähnlicher Weise wurde aus der Methylthiobenzhydrazino-*d*-arabinose-*l*-thiomilchsäure vom Schmp. $131^\circ\text{--}132^\circ$, $[\alpha]_D^{20} = -600^\circ \rightarrow -214^\circ$ und $C_M^{20} = 7,5 \times 10^{-4}$ mit *d*-Thiomilchsäure ein Produkt vom Schmp. $141^\circ\text{--}144^\circ$, $[\alpha]_D^{20} = +556^\circ \rightarrow +235^\circ,5$ und $C_M^{20} = 9,1 \times 10^{-4}$ erhalten; das daraus gewonnene Gemisch von Dithiodilactylsäuren zeigte $[\alpha]_D^{20} = +326^\circ$, und das aus der zurückgewonnenen Thiomilchsäure erhaltene ergab $[\alpha]_D^{20} = -151^\circ$. Als Gegenstück zu dem obigen Schema hat man also hier:



Während die Methylthiobenzhydrazino-*d*-arabinose-*d*-thiomilchsäure von der *l*-Thiomilchsäure nur verhältnismässig wenig angegriffen wird, geht beim Umsatz der Methylthiobenzhydrazino-*d*-arabinose-*l*-thiomilchsäure mit der *d*-Thiomilchsäure die Substitution der *l*-Thiomilchsäure durch die *d*-Form so weit, dass ein

mit dem in jenem Falle fast identisches System entsteht. Inwieweit das C₁-Atom des Zuckers hierbei mitwirkt, lässt sich nicht sagen, aber aus den Versuchen geht jedenfalls hervor, dass unter den vorhandenen Umständen die Methylthiobenzhydrazino-*d*-arabinose-*d*-thiomilchsäure gegen die *l*-Thiomilchsäure beständiger ist als die Methylthiobenzhydrazino-*d*-arabinose-*l*-thiomilchsäure gegen die *d*-Thiomilchsäure. Um diese Ergebnisse zu kontrollieren und zu erweitern, wurde auch eine Serie von Versuchen mit *l*-Arabinose-methylthiobenzhydrazid und *d,l*-Thiomilchsäure angestellt, wobei die in der Tabelle 6 zusammengestellten, mit je 0,01 Mol des Methylthiobenzhydrazids und 0,02 Molen der Thiomilchsäure erhaltenen Resultate erzielt wurden.

Tabelle 6.

Lösungsmittel	Zeit, Stunden	Reakt.- Prod., g	[α] _D ²⁰ der Dithiodilactyl- säuren aus	
			Reakt.-Prod.	unverbr. Thiomilchs.
10 ml H ₂ O	1/2	4,1	— 4°	+ 10°
» » »	24	4,0	— 20°	+ 26°
» » 1-n. HCl	1/2	4,0	— 33°	+ 46°
» » »	24	3,4	— 168°	+ 81°
5 » 2-n. »	1/2	4,0	— 263°	+ 217°
» » »	24	3,8	— 298°	+ 242°
» » » »	72	2,6	—	+ 121°

In Übereinstimmung mit den obigen Befunden wird also um so mehr Methylthiobenzhydrazino-*l*-arabinose-*l*-thiomilchsäure erhalten, je länger ein Versuch im Gang gehalten wird; die Bildung dieser Form aus einer primär entstandenen Methylthiobenzhydrazino-*l*-arabinose-*d*-thiomilchsäure und noch vorhandener *l*-Thiomilchsäure wird stark vom Chlorwasserstoff beschleunigt. Die Aktivität der unverbrauchten Thiomilchsäure geht indessen durch ein Maximum und gleichzeitig wird die Ausbeute an Reaktionsprodukt kleiner, was darauf beruht, dass dieses Produkt in dem sauren Medium allmählich zersetzt wird. Diese Zersetzung verläuft offenbar bei der Methylthiobenzhydrazino-*l*-arabinose-*l*-thiomilchsäure am schnellsten, wobei eine gewisse Menge *l*-Thiomilchsäure frei wird, was die Aktivität der zum Schluss wiedergewonnenen Thiomilchsäure bzw. des daraus erhältlichen Dithiodilactylsäure-Gemisches herabsetzt.

Mit Hinsicht auf eine eventuelle Verwendung von Zucker-methylthiobenzhydraziden zwecks Spaltungen inaktiver Mercaptane wurden teils die Versuche mit den Arabinose-methylthiobenzhydraziden und der *d,l*-Thiomilchsäure in verschiedenen Weisen variiert, teils ähnliche Versuche auch mit den Methylthiobenzhydraziden anderer Zuckerarten angestellt. Hierbei traten ähnliche Erscheinungen wie bei den Arabinose-Derivaten auf, aber die Effekte waren durchgehend kleiner und wegen stärkerer Zersetzungen der Primärprodukte meistens weniger zuverlässig, und sterische Regelmässigkeiten wie bei den Umsetzungen der Zucker-thiobenzhydrazide mit der α-Brompropionsäure im Kap. IV konnten nicht konstatiert werden.

Dank verschiedener Löslichkeiten und Bildungsgeschwindigkeiten der Zucker-thiobenzhydrazide und ihrer Derivate ist es oft möglich, mit Hilfe des Thiobenz-

hydrazids in *Mischung* mit einander vorkommende Zuckerarten von einander zu separieren oder wenigstens qualitativ nachzuweisen. Einige Versuche hierüber mit binären Zucker-Gemischen werden im letzten Kapitel dieser Mitteilung beschrieben. Praktische Verwendungen hat diese Methode bei Identifizierungen der in Alkoholsäuren des Fichtenholzes (8) und im Frühjahrssaft der Birke (9) vorkommenden Zuckerarten gefunden; an Hand weiterer aktuellen Bedürfnisse soll die Methodik weiter ausgebildet werden.

Um auch bei beschränktem Zugang an Material die Identifizierung von Zuckern mit Hilfe des Thiobenzhydrazids zu ermöglichen, wurden auch *Debye-Scherrer*-Photogramme der Zucker-thiobenzhydrazide und der ihnen entsprechenden Phenylthiodiazol-Derivate aufgenommen. Dies wurde von Dr. AXEL JOHANSSON besorgt; aus seiner Mitteilung hierüber (10) geht hervor, dass diese Photogramme für diagnostische Zwecke sehr gut geeignet sind. Ausserdem ersieht man aus den Photogrammen der stereoisomeren Arabinose-thiobenzhydrazide, dass die inaktive Form eine Racem-Verbindung ist, während in derselben Weise konstatiert werden kann, dass das inaktive Arabinose-phenylthiodiazol aus einem Konglomerat besteht. Mit Hilfe von Photogrammen zwei verschiedene Zuckerarten nachzuweisen, deren Thiobenzhydrazide im Gemisch mit einander vorliegen, gelingt jedoch nicht immer, denn wenn das eine Thiohydrazid mit weniger als ca. 20 % in dem Gemisch vorhanden ist, erhält man nur die Linien der überschüssigen Komponente.

Die zu dieser Untersuchung benutzten, selteneren Pentosen und Hexosen wurden meistens von *Pfanstiehl Chemical Co.*, Waukegan, Illinois, bezogen, während der Verf. Hrn. Professor Dr. A. NORDAL in *Oslo* für die Überlassung der Sedoheptose herzlichst zu danken hat. — Das Thiobenzhydrazid wurde entweder in der früher beschriebenen Weise (1) aus Thiobenzoylthioglykolsäure¹ und Hydrazin dargestellt, oder es wurde analog der Darstellung von Xanthogenhydraziden gemäss WANGEL (11) durch direkte Umsetzung von Kaliumdithiobenzoat mit Hydrazin bereitet. Trotz des komplizierten Reaktionsverlaufes, den WUYTS und LACOURT (12) bei der Umsetzung von freier Dithiobenzoessäure mit Hydrazinhydrat fanden, gelingt es hierbei, das Thiobenzhydrazid in bequemer Weise und mit annehmbarer Ausbeute darzustellen. Das Dithiobenzoat braucht dabei nicht zuerst isoliert zu werden, sondern man sättigt eine Lösung von 30 g Kaliumhydroxyd in 150 ml gew. Alkohol mit Schwefelwasserstoff und fügt eine Lösung der gleichen Menge des Hydroxyds in gleich viel Alkohol hinzu, worauf 18 ml Benzotrichlorid in mehreren Portionen und, wenn nötig, unter Kühlung, damit die Temperatur nicht 70° übersteigt, zugesetzt werden. Am folgenden Tag wird das ausgeschiedene Kaliumchlorid abgenutscht und mit 50 ml Alkohol gewaschen, wonach das Filtrat mit 150 ml Wasser versetzt und dann in gelinder Wärme bis auf 160 g Gewicht eingedunstet wird. Die dann von ca. 10 g eines abgeschiedenen, dickflüssigen und schwach kristallhaltigen Öls abdekantierte, dunkelrote Lösung nebst etwas Spülwasser wird mit 20 ml einer 85 %-igen Lösung von Hydrazinhydrat versetzt, wobei unter schwacher Wärmeentwicklung allmählich ein gelblicher Brei von ca. 3 g eines in der Bodenschicht klebrigen Pulvers entsteht. Am nächsten Tag wird das Pulver abgenutscht und das gelbe Filtrat in mehreren Portionen mit 27 ml Essigsäure versetzt, wobei Emulgierung, Entwicklung von Schwefelwasserstoff und Kristallisation eintreten; nach einiger Zeit erhält man beim Absaugen, Waschen mit Wasser und Trocknen an der Luft

¹ Diese Säure sowohl als das Thiobenzhydrazid selbst kann von A.-B. LKB-Produkte, Box 12035, *Stockholm 12*, bezogen werden.

15 à 16 g eines Thiobenzhydrazids vom Schmp. 79–81° und 17,88 % N sowie 24,15 % S enthaltend. Beim Umkristallisieren von 30 g derartiger Produkte aus 300 ml Benzol bekommt man 22 à 23 g reines Thiobenzhydrazid als blassgelbe, schmale Prismen vom Schmp. 81°–82° und mit:

Für $C_7H_8N_2S$ (152,14):

ber.: N 18,42, S 21,07%; gef.: N 18,36, S 21,18 %.

Durch Ausschütteln des Filtrates mit verdünnter Natronlauge und Ansäuern mit Essigsäure kan der grösste Teil des in Lösung verbliebenen Thiobenzhydrazids zurückgewonnen werden.

Für die Ausführung sämtlicher Elementaranalysen hat der Verf. Frau MAJBRIIT VESTERGAARD und für sonstige Mithilfe Hrn. Dr. BENGT WEIBULL bestens zu danken.

II. Darstellungen und allgemeine Eigenschaften der Zucker-thiobenzhydrazide

1. Arabinose-thiobenzhydrazide

A. *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid

Beim Versetzen einer Lösung von 3,0 g *l*-Arabinose in 15 ml Wasser mit 3,0 g Thiobenzhydrazid in 15 ml 2-n. Salzsäure entstand ein opaleszendes Gemisch, welches bald in eine gelatinöse Masse überging. Am folgenden Tag bestand das Reaktionsgemisch aus einem Brei von mikroskopischen Sphärokristallen, welche abgesaugt, mit 20 ml Wasser gewaschen und dann eine Stunde mit 50 ml Wasser geschüttelt wurden, wonach sie wieder abgesaugt, mit 20 ml Wasser gewaschen und an der Luft getrocknet wurden. Sie wogen dann 3,5 g, schmolzen bei 165°–166° (unter Gasentwicklung zu einer gelben Flüssigkeit) und ergaben bei der Analyse:

Für $C_{12}H_{16}O_4N_2S$ (284,33):

ber.: C 50,69, H 5,67, N 9,85, S 11,28 %,
gef.: C 50,85, H 5,68, N 9,85, S 11,38 %.

In Pyridin und bei $c = 5$ (g in 100 ml) zeigte das Produkt $[\alpha]_D^{20} = -35^\circ,1$. Die Mutterlauge des Rohproduktes wurde mit einer Lösung von 5 g Natriumazetat in 10 ml Wasser versetzt, wobei schnell ein Brei wie oben entstand, welcher beim Absaugen usw. noch 1,8 g *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid vom Schmp. 164°–165° (wie oben), mit 9,75 % N, 11,29 % S und (in Pyridin wie oben) $[\alpha]_D^{20} = -34^\circ,2$ lieferte.

Aus 1,5 g *l*-Arabinose in 10 ml Wasser und 1,55 g Thiobenzhydrazid in 10 ml 1,1-n. Salzsäure wurde ein opaleszendes Gemisch erhalten, welches sich schnell klärte und dann in einigen Minuten zu einer gelatinösen Masse erstarrte. Bis zum folgenden Tag ging diese Masse in einen Brei aus zu dichten Bällen vereinigten, nadelförmigen Prismen über, welche nach Absaugen, Waschen mit 10 ml Wasser und Trocknen an der Luft 1,9 g wogen, bei ca. 159°–161° unter Gasentwicklung schmolzen, 11,47 % S enthielten und (in Pyridin wie oben) $[\alpha]_D^{20} = -27^\circ,5$ zeigten.

— Bei einem ähnlichen Versuch, aber mit 3,1 g Thiobenzhydrazid in 20 ml 1,1-n. Salzsäure, wurde sofort ein klares Gemisch erhalten, welches nach ca. 15 Minuten Kristallaggregate wie oben abzuscheiden begann. Diese wurden am folgenden Tag abgesaugt und mit 10 ml 1-n. Salzsäure und der gleichen Menge Wasser gewaschen, wobei die Ausbeute an einem bei 161°–163° wie oben schmelzenden, 11,43 % S enthaltenden und $[\alpha]_D^{20} = -34^{\circ},4$ (in Pyridin) zeigenden Produkt 2,3 g betrug. — Als dagegen 6,0 g *l*-Arabinose in 20 ml Wasser mit 3,1 g Thiobenzhydrazid in 20 ml 1,1-n. Salzsäure umgesetzt wurden, entstanden bis zum folgenden Tag 1,5 g kleine Sphärökristalle (Präp. A) vom Schmp. 200°–203° (unter Braunfärbung und Gasentwicklung), von denen 1,0 g beim Umkristallisieren aus 100 ml gew. Alkohol 0,7 g farblose Nadelchen vom Schmp. 212°–213° wie oben (Präp. B) ergaben. Eine Lösung von 0,4052 g dieses Präparates in Pyridin zu 20,04 ml zeigte $2\alpha_D^{20} = +1^{\circ},01$, $[\alpha]_D^{20} = +25^{\circ},0$; hieraus sowie aus den Analysen geht hervor, dass infolge irgend eines Oxydationsvorganges das im folgenden Kapitel näher beschriebene *l*-Arabinotetraoxybutyl-phenyl-thiodiazol entstanden war.

Für $C_{12}H_{14}O_4N_2S$ (282,31):

ber.:	C 51,05,	H 5,00,	N 9,93,	S 11,36 %,
gef., Präp. A:	C 51,03,	H 5,05,	N 9,98,	S 11,25 %,
» , » B:	C 50,94,	H 4,97,	N 9,98,	S 11,31 %.

Beim Verarbeiten der Mutterlauge des obigen Rohproduktes wurden zum Schluss nach Zusatz von noch 1,5 g Thiobenzhydrazid 1,4 g *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid vom Schmp. 166°–168° wie gew., mit 11,23 % S und $[\alpha]_D^{20} = -36^{\circ},7$ (in Pyridin) erhalten.

Als bei einem anderen Versuch 3,0 g *l*-Arabinose in 15 ml Wasser¹ mit 3,05 g Thiobenzhydrazid in 15 ml gew. Alkohol versetzt wurden, entstand eine schwach gelbgrüne Lösung, welche *t* Minuten nach der Mischung und bei 20°² die folgenden Drehungen zeigte:

<i>t</i> :	2	5	10	20	40
0,5 α_D^{20} :	+4°,12	+3°,82	+3°,32	+2°,42	+1°,25.

Wegen beginnender Kristallisation konnten keine weiteren Drehungsbestimmungen gemacht werden, und am nächsten Tag lieferte der dann entstandene Brei aus farblosen Nadeln 5,2 g mit 10 ml 50 %-igem Alkohol gewaschenes und an der Luft getrocknetes Produkt vom Schmp. 167°–168° (Zersetzung), mit 50,85 % C und 5,72 % H und (in Pyridin wie oben) von $[\alpha]_D^{20} = -36^{\circ},5$.

Aus 3,0 g *l*-Arabinose in 15 ml Wasser und 3,05 g Thiobenzhydrazid in 20 ml 1-n. Natronlauge entstand eine schwach gelbgrüne Lösung, welche *t* Minuten nach der Herstellung die folgenden Drehungen zeigte:

<i>t</i> :	2	5	10	20	40	80
0,5 α_D^{20} :	+3°,67	+3°,47	+3°,22	+2°,82	+2°,42	+2°,22
<i>t</i> :	160	300	600	1 260	1 980	
0,5 α_D^{20} :	+2°,42	+2°,90	+3°,52	+3°,62	+3°,62	

¹ Bei allen derartigen Versuchen wurden die Zuckerlösungen wenigstens 12 Stunden im voraus bereitet.

² Temperatur des Arbeitszimmers.

³ Bedeutet Drehung in 0,5-dm Rohr.

Als die Lösung dann mit 2 g Essigsäure versetzt wurde, entstand schnell ein gelatinöses Gemisch, welches bis zum folgenden Tag in einen Brei aus prismatischen Nadelchen überging. Nach Absaugen, Waschen mit 20 ml Wasser und Trocknen an der Luft wog das Produkt 5,2 g, schmolz bei 162° – 164° (Zersetzung), enthielt 9,78 % N und 11,28 % S und zeigte (in Pyridin wie oben) $[\alpha]_D^{20} = -36,^{\circ}3$. — Da die Drehungsänderung des primären Reaktionsproduktes eine Bestimmung des Endpunktes der Umsetzung aus den Drehungsbestimmungen unmöglich machte, wurden bei einem neuen Versuch Proben des Reaktionsgemisches mit verdünnter Essigsäure versetzt, wobei nach 24 Stunden keine Emulgierung mehr durch freigemachtes, unverbrauchtes Thiobenzhydrazid eintrat. Nach Zusatz von Essigsäure wie oben wurden dann 5,2 g Reaktionsprodukt vom Schmp. 165° – 166° (Zers.) und $[\alpha]_D^{20} = -36,^{\circ}7$ erhalten.

Aus 3,0 g *l*-Arabinose und 1,5 g Thiobenzhydrazid in 10 ml 1-n. Natronlauge wurde eine Lösung erhalten, welche nach 2 Tagen eine Spur eines schlammartigen Pulvers abgeschieden hatte. Das Filtrat davon ergab mit 10 ml 2-n. Essigsäure 2,4 g *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid in Form dichter Kristallbälle vom Schmp. 164° – 166° wie gew., mit 11,48, ber. 11,28, % S und $[\alpha]_D^{20} = -35,^{\circ}4$ (in Pyridin). Die Mutterlauge wurde mit derselben Menge Thiobenzhydrazid in 10 ml Alkohol versetzt, wonach sie 2,3 g *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid vom Schmp. 165° – 167° wie gew., mit 11,26 % S und von $[\alpha]_D^{20} = -36,^{\circ}5$ (in Pyridin) ausschied.

Beim Erhitzen von 3,0 g rohem *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid mit 50 ml gew. Alkohol entstand in 3 Minuten eine Lösung, welche beim Erkalten 2,5 g haarfeine Nadelchen vom Schmp. 167° – 168° (Zers.) ausschied.

Für $C_{12}H_{16}O_4N_2S$ (284,33):

ber.: C 50,69, H 5,67, N 9,86, S 11,28 %,
gef.: C 50,64, H 5,62, N 9,91, S 11,31 %.

Von diesem Präparat zeigten 0,5024 g in Pyridin zu 10,04 ml gelöst sofort und nach 2 Stunden $\alpha_D^{20} = -1^{\circ},86$, $[\alpha]_D^{20} = -37^{\circ},2$ und $[M]_D^{20} = -105^{\circ},8$. — Als andererseits 0,5027 g davon mit 1,95, ber. 1,77, ml 1,00-n. Natronlauge und etwas Wasser bis zur Lösung geschüttelt wurden und die Lösung auf 10,04 ml Volumen verdünnt wurde, zeigte diese *t* Minuten nach dem Zusatz der Lauge:

Tabelle 7.

<i>t</i>	α_D^{20}	C_M^{20}	<i>t</i>	α_D^{20}	C_M^{20}
35	$+0^{\circ},37$	—	70	$+1^{\circ},86$	0,035
40	$+0^{\circ},62$	0,025	90	$+2^{\circ},12$	0,033
45	$+0^{\circ},84$	0,025	130	$+2^{\circ},37$	—
50	$+1^{\circ},04$	0,026	390	$+2^{\circ},47$	—
60	$+1^{\circ},50$	0,031	730	$+2^{\circ},47$	—

Für $t = \infty$: $[\alpha]_D^{20} = +49^{\circ},3$; $[M]_D^{20} = +140^{\circ},2$; $C_M^{201} = 0,030$.

¹ C_M^{20} bedeutet die Geschwindigkeitskonstante der Mutarotation bei $+20^{\circ}$ C und wurde, von einem willkürlichen *t*-Wert ausgehend, aus der Gleichung $C_M^{20} = \frac{1}{t} \ln \frac{\alpha_0 - \alpha_{\infty}}{\alpha_t - \alpha_{\infty}}$ berechnet.

Beim Erhitzen von 2 g *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid auf dem Wasserbad mit 40 ml Wasser löste sich praktisch alles in etwa 5 Minuten, und aus der Lösung wurden beim Erkalten 1,7 g nadelförmige Prismen vom Schmp. 167°–168° und $[\alpha]_D^{20} = -36^\circ,5$ (in Pyridin) erhalten. — Bei einem neuen Versuch mit denselben Mengen wurde das Erhitzen 2 Stunden fortgesetzt. Hierbei trat Emulgierung ein und es wurde eine kleine Menge farbloser Kristallschuppen ausgeschieden, welche als 2,5-Diphenyl-1,3,4-thiodiazol vom Schmp. 140°–142° und mit 13,26, ber. 13,46, % S identifiziert wurden. Nach noch 4 Stunden auf dem Wasserbad hatte die Mutterlauge davon noch ein wenig solcher Schuppen ausgeschieden, aber aus dem Filtrat davon wurden beim Erkalten nur klebrige Massen ausgeschieden. — Nach 1- und 10-stündigem Schütteln von je 2,85 g *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid mit 20 ml 1-n. Salzsäure waren 2,6 g vom Schmp. 167°–168°, bzw. 2,5 g vom Schmp. 165°–167° davon ungelöst verblieben; die Filtrate ergaben mit Natriumazetat nur Spuren von kristallinen Fällungen. — Auch beim Erhitzen von 2,8 g *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid mit 20 ml 1-n. Salzsäure trat Zersetzung unter Bildung von klebrigen Produkten ein, aber hier konnten nach einer Stunde 0,4 g eines in Alkohol schwerlöslichen Kristallpulvers isoliert werden, welches nach dem Umkristallisieren aus Alkohol bei 212°–213° schmolz und 51,02 % C und 5,10 % H enthielt, woraus hervorgeht, dass es aus dem schon oben erhaltenen und durch Autoxydation entstandenen *l*-Arabinotetraoxibutyl-phenyl-thiodiazol bestanden hat.

Eine mit Phenolphthalein versetzte Lösung von 0,3062 g *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid in 20 ml 50 %-igem, warmem Alkohol hielt sich beim Erkalten unverändert und wurde dann von 1,72 ml 0,1000-n. Natronlauge schnell vorübergehend rot gefärbt. Nach Zusatz von noch 9,15 ml der Lauge wurde sie nach einer Stunde von 0,95 ml 0,1000-n. Salzsäure entfärbt, Äquiv.-Gew. ber. 284,3, gef. 309. Die rote Farbe kam indessen bald wieder zurück, und nach Zusätzen von je 1,00 ml der Säure trat dies wieder nach 0,5, 2, 5, 12 bzw. 35 Minuten ein. Eine folgende Portion der Säure war jedoch noch nach 24 Stunden nicht vollständig verbraucht; die Lösung ergab danach einen schwachen, allmählich verblassenden Umschlag mit 0,40 ml der Lauge. — Eine Lösung von 0,2997 g des Thiohydrazids in 50 %-igem Alkohol wie oben verbrauchte gegen Phenolphthalein nach je Δt Minuten die folgenden Mengen der 0,1000-n. Lauge:

Δt :	0	5	10	30	60	120	60	120	180	
ml:	2,00	0,30	0,45	0,50	0,45	0,40	0,35	0,30	0,30	Summe 5,05 ml,

und nach Zusatz von noch 6,50 ml der Lauge wurden den folgenden Tag 1,95 ml (Äquiv.-Gew. = 312) und dann weiter nach je Δt Minuten

Δt :	10	10	10	10	10	20	30	30	
ml:	0,45	0,20	0,20	0,20	0,20	0,15	0,15	0,15	Summe 3,65 ml

0,1000-n. Salzsäure verbraucht. — Schliesslich wurde eine Lösung von 0,3045 g des Thiohydrazids in 10 ml 50 %-igem Alkohol gegen Phenolphthalein rot für 1,80 ml 0,1000-n. Lauge; nach eingetretenen Entfärbungen wurde sie mit je 0,50 ml Lauge nach 1, 2, 4, 7, 11, 20 bzw. 60 Minuten versetzt. Nach Zusatz von noch 6,57 ml, Summe 11,87 ml, Lauge, wurden 1,70 ml der Salzsäure zur Entfärbung verbraucht, Äquiv.-Gew. 299. Nach Zusätzen von je 0,50 ml der Säure wurde die Lösung dann nach 1, 2, 3, 7, 15, 45, 95 bzw. 400 Minuten rötlich und zum Schluss opaleszierend.

Aus 2,85 g *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid und 22 ml 0,5-n. Natronlauge wurde bei 1/4-stündigem Schütteln eine Lösung erhalten, welche unmittelbar mit 10 ml 2-n. Essigsäure versetzt wurde, wobei zuerst ein gelatinöser Brei entstand, und danach 2,7 g Kristallpulver vom Schmp. 167°–168° und $[\alpha]_D^{20} = -36^{\circ},8$ (in Pyridin) ausgeschieden wurden. — Bei einem neuen Versuch wurden 2,9 g des Thiohydrazids in 20 ml 1-n. Natronlauge gelöst und die allmählich gelbrote, nach 2 Tagen braune Lösung dann mit 12 ml der Essigsäure angesäuert. Hierbei entstand eine Emulsion, welche bis zum folgenden Tag 2,15 g eines korkfarbenen Pulvers vom Schmp. ca. 150°–153° (Zers.) ausschied. Beim Umkristallisieren aus 45 ml gew. Alkohol wurden hieraus 1,45 g unverändertes Thiohydrazid als haarfeine, farblose Nadelchen erhalten, welche bei 167°–168° wie gew. schmolzen und (in Pyridin) $[\alpha]_D^{20} = -37^{\circ},4$ zeigten.

Beim Schütteln von 4,5 g *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid mit 30 ml 0,5-n. Natronlauge entstand eine schwach trübe Lösung, welche nach dem Filtrieren mit einigen Tropfen verdünnter Essigsäure vorübergehend gegen Phenolphthalein sauer gemacht wurde. Danach wurden Proben davon mit den gleichen Mengen wenn möglich 0,5-n. Lösungen der im Folgenden angegebenen Salze versetzt, wobei:

mit *Calciumchlorid*, *Strontiumnitrat*, *Bariumchlorid* und *Magnesiumsulfat* keine Veränderung eintrat,

mit *Zinksulfat* eine weisse, käsige Fällung entstand, welche den folgenden Tag aus rosafarbigem, spröden Massen nebst einem weissen, feinkörnigen Pulver bestand,

mit *Cadmiumsulfat* eine weisse, käsige Fällung erhalten wurde, welche in teigige Massen überging,

mit *Quecksilberchlorid* eine gelblich weisse, käsige Fällung entstand, welche den folgenden Tag aus einem amorphen Pulver nebst kleinen Sternchen von prismatischen Kristallen bestand,

mit *Kupfersulfat* eine graugrüne, käsige Fällung erhalten wurde, welche allmählich in spröde, fast schwarze Massen und ein feinkörniges Pulver überging,

mit *Silberniträt* eine weisse, käsige Fällung entstand, welche dann bis zum folgenden Tag in grauschwarze, spröde Massen überging,

mit *Bleiazetat* eine gelbliche, käsige Masse erhalten wurde, welche den nächsten Tag aus einer fast gelatinösen Masse von einem braunschwarzen, amorphen Pulver bestand,

mit *Mangansulfat* eine gelbliche Lösung entstand, welche sich bald emulgierte und bis zum folgenden Tag ein oberflächlich graugrünes, in tieferen Schichten sandfarbenes, feinkörniges Pulver ausschied,

mit *Eisenchlorid* unter schwachen Zeichen einer Gasentwicklung fast schwarze, klebrige Massen ausgefällt wurden, welche den folgenden Tag teilweise in ein weisses Kristallpulver und übrigen in schwarzgrüne, spröde Massen übergegangen waren (vergl. S. 70),

mit *Kobaltchlorür* eine braune Fällung entstand, welche den folgenden Tag aus einer fast gelatinösen, rotbraunen Masse von amorphem Pulver bestand,

mit *Nickelsulfat* eine braungelbe Fällung erhalten wurde, welche den folgenden Tag aus einem teilweise zusammengesinterten Pulver bestand.

Beim Zusammenreiben von 2,85 g *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid mit 2 g *Thioglykolsäure* in 5 ml 2-n. Salzsäure entstand ein dünner Brei, welcher nach einer Stunde beim Absaugen und Waschen mit 10 ml Wasser 1,7 g unverbrauchtes Thiohydrazid vom Schmp. 166°–167° und mit 11,22, ber. 11,28, % S lieferte. Das Filtrat setzte bis zum folgenden Tag 0,6 g Bälle von nadelförmigen Prismen ab, welche

bei 149°–152° eine trübe Schmelze ergaben und sich der Zusammensetzung eines Tetraoxybutyl-thiobenzoylamino-oxothiazolidins (Formel V, S. 35) erwiesen:

Für $C_{14}H_{18}O_5N_2S_2$ (358,42):

ber.: C 46,91,	H 5,06,	N 7,82,	S 17,89 %
gef.: C 46,71,	H 5,07,	N 7,77,	S 17,61 %

Beim Schütteln von 0,2043 g des Produktes während 10 Minuten mit 20 ml 50 %-igem Alkohol verblieben 0,104 g davon ungelöst; das Filtrat zeigte 25 und 300 Minuten nach dem Zusatz des Alkohols $0,947 \alpha_D^{20} = -1^{\circ},08$, dem spez. Drehungsvermögen $[\alpha]_D^{20} = -227^{\circ}$ entsprechend.

B. *d*-Arabinose-thiobenzhydrazid

Aus 3,25 g *d*-Arabinose in 15 ml Wasser und 3,3 g Thiobenzhydrazid in 15 ml Alkohol wurden wie bei der *l*-Arabinose oben 5,65 g Kristallpulver vom Schmp. 165°–166° (Zers.) und $[\alpha]_D^{20} = +37^{\circ},4$ (in Pyridin) erhalten. Nach Umkristallisierung aus gew. Alkohol schmolz das dabei als fast haarfeine Nadelchen erhaltene *d*-Arabinose-thiobenzhydrazid bei 167°–168° (Zers.) und zeigte für 0,5029 g in Pyridin zu 10,04 ml gelöst $\alpha_D^{20} = +1^{\circ},87$, $[\alpha]_D^{20} = +37^{\circ},3$ und $[M]_D^{20} = +106^{\circ},1$, während 0,5229 g in 2,02 ml (ber. 1,84 ml) 1,00-n. Natronlauge und Wasser zu 10,04 ml gelöst den Endwert $\alpha_D^{20} = -2^{\circ},58$, $[\alpha]_D^{20} = -49^{\circ},5$ und $[M]_D^{20} = -140^{\circ},7$ ergaben.

C. *rac*-Arabinose-thiobenzhydrazid

Nach Auflösen von 0,582 g *d*- und der gleichen Menge *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid in 10 ml heissem, gew. Alkohol kristallisierten beim Erkalten 0,9 g Prismen oder schmale Täfelchen aus, welche bei 161°–162° eine blasige Schmelze lieferten und 11,31, ber. 11,28, % S enthielten. — Als 8,4 ml der polarimetrierten Lösung des *d*-Arabinose-thiobenzhydrazids in Natronlauge oben zusammen mit einer Lösung von 0,437 g des *l*-Arabinose-thiobenzhydrazids in 2 ml 1-n. Natronlauge mit 2 ml 2-n. Salzsäure versetzt wurden, wurden 0,7 g mikroskopische Bälle aus flachen Prismen vom Schmp. 161°–162° (wie oben) und mit 9,71, ber. 9,85, % N erhalten.

Die inaktive Form des Arabinose-thiobenzhydrazids schmilzt also bei einer um 6 Grade niedrigeren Temperatur als die aktiven Formen, aber wenigstens in 50 %-igem Alkohol ist sie dagegen anscheinend (siehe auch S. 135) weniger löslich als diese und, da sie ein ganz anderes Röntgenphotogramm als die aktiven Formen gibt (10), ist sie oben als *rac*-Form bezeichnet worden.

2. *d*-Xylose-thiobenzhydrazid

Beim Versetzen einer Lösung von 3,0 g *d*-Xylose in 15 ml Wasser mit 3,05 g Thiobenzhydrazid in 15 ml 2-n. Salzsäure entstand eine opaleszierende Lösung, welche sich bald klärte und allmählich smaragdgrün, danach braungrün und bis zum folgenden Tag braunrot wurde, wonach sie bei der freiwilligen Eindunstung eine rotbraune, nur Spuren von Kristallen enthaltende, klebrige Masse lieferte. — Bei einem neuen Versuch zeigte das Reaktionsgemisch nach *t* Minuten:

<i>t</i> :	2	4	7	15	30	45	60
0,5 α_D^{20} :	-0^{\circ},28	-1^{\circ},38	-2^{\circ},53	-3^{\circ},53	-3^{\circ},58	-3^{\circ},53	-3,48.

Die nach einer Stunde grüne Lösung wurde dann mit 5 g Natriumazetat in 10 ml Wasser versetzt; nach Anreiben schied sie dann bis zum folgenden Tag 4,5 g kurze, farblose Prismen vom Schmp. 115° – 117° (Schmelze blasig) und $[\alpha]_D^{20} = -43^{\circ},4$ (in Pyridin) aus (Präp. 1).

Eine aus 3,0 g *d*-Xylose in 15 ml Wasser und 3,05 g Thiobenzhydrazid in 15 ml Alkohol bereitete Lösung zeigte *t* Minuten nach der Mischung:

<i>t</i> :	2	10	100	300	720	2 050	4 260	5 700
$0,5 \alpha_D^{20}$:	$+0^{\circ},80$	$+0^{\circ},46$	$-0^{\circ},58$	$-1^{\circ},28$	$-1^{\circ},76$	$-2^{\circ},40$	$-2^{\circ},66$	$-2^{\circ},68$,

und ging dann bei der freiwilligen Eindunstung auf 15 g Gewicht in einen Brei aus flachen Prismen über, welche nach dem Absaugen, Waschen mit 15 ml Wasser und Trocknen an der Luft 4,7 g wogen, bei 116° – 117° wie oben schmolzen und (in Pyridin) $[\alpha]_D^{20} = -44^{\circ},2$ zeigten (Präp. 2).

Ein Gemisch aus 3,0 g *d*-Xylose in 15 ml Wasser und 3,05 g Thiobenzhydrazid in 20 ml 1-n. Natronlauge zeigte wie oben:

<i>t</i> :	2	10	20	40	150	480	1320	2820
$0,5 \alpha_D^{20}$:	$+0^{\circ},72$	$+0^{\circ},62$	$+0^{\circ},57$	$+0^{\circ},62$	$+0^{\circ},88$	$+1^{\circ},29$	$+1^{\circ},58$	$+1^{\circ},63$,

wonach es mit 2 g Essigsäure 4,7 g *d*-Xylose-thiobenzhydrazid vom Schmp. 116° à 117° – 118° und $[\alpha]_D^{20} = -44^{\circ},6$ lieferte (Präp. 3). — Bei einem neuen Versuch in der gleichen Weise wurde wie bei der *l*-Arabinose, S. 47, festgestellt, dass die Umsetzung nach 24 Stunden beendet war; mit Essigsäure wurden hier 4,5 g Produkt vom Schmp. 117° – 118° und $[\alpha]_D^{20} = -44^{\circ},2$ erhalten.

Die Analysen der verschiedenen Präparate ergaben:

Für $C_{12}H_{16}O_4N_2S$ (284,33):

ber.: C 50,69,	H 5,67,	N 9,85,	S 11,28 %,
gef.: C 51,09 ¹ , 50,96 ² ,	H 5,59 ¹ , 5,63 ² ,	N 9,86 ³ ,	S 11,33 ³ %.

Beim Umkristallisieren von 3,5 g rohem *d*-Xylose-thiobenzhydrazid aus 15 ml gew. Alkohol wurden 2,3 g farblose, flache Prismen oder schmale Schuppen vom Schmp. 117° – 118° erhalten, von denen 0,5026 g in Pyridin zu 10,04 ml gelöst sofort und nach 2 Stunden $\alpha_D^{20} = -2^{\circ},23$, $[\alpha]_D^{20} = -44^{\circ},6$ und $[M]_D^{20} = -126^{\circ},8$ zeigten. In 50 vol.-%-igem Alkohol zu 10,04 ml gelöst zeigten 0,5085 g Subst. sofort und nach 2 Stunden $\alpha_D^{20} = -0^{\circ},88$, $[\alpha]_D^{20} = -17^{\circ},4$ und $[M]_D^{20} = -49^{\circ},5$, und 0,5060 g in 1,96 (ber. 1,78) ml 1,00-n. Natronlauge und Wasser zu 10,04 ml zeigten nach 12 und 60 Minuten $\alpha_D^{20} = +1^{\circ},19$, $[\alpha]_D^{20} = +23^{\circ},6$ und $[M]_D^{20} = +67^{\circ},1$. — Eine Lösung von 2,5 g desselben Thiohydrazids in 25 ml warmem Azeton schied beim Erkalten 1,5 g fast haarfeine Nadelchen aus, welche bei 117° – 118° schmolzen und (in Pyridin wie oben) $[\alpha]_D^{20} = -44^{\circ},5$ zeigten. — Beim Umkristallisieren von 3 g des Thiohydrazids aus 75 ml Essigsäureäthylester wurden 2,5 g dichte Bälle von nadelförmigen Prismen erhalten, welche bei 117° – 118° schmolzen und (in Pyridin) $[\alpha]_D^{20} = -44^{\circ},7$ zeigten. — Bei kurzem Erhitzen von 4 g des Thiohydrazids mit 25 ml Wasser wurde eine klare Lösung erhalten, welche beim Erkalten langsam 3 g eines feinkristallinischen Pulvers vom Schmp. 115° – 117° und $[\alpha]_D^{20} = -43^{\circ},7$ (in Pyridin) ausschied, während bei länger andauerndem Erhitzen Trübung eintrat und zum Schluss klebrige Zersetzungsprodukte ausgeschieden wurden. Solche Produkte wurden auch erhalten, wenn Lösungen des Thiohydrazids in Natronlauge erwärmt wurden.

¹ Präp. 1. ² Präp. 2. ³ Präp. 3.

Nach 1-stündigem Schütteln von 2,85 g *d*-Xylose-thiobenzhydrazid mit 20 ml 1-n. Salzsäure waren 1,2 g davon noch ungelöst und vom Schmp. 116°–117°, während das Filtrat davon mit 3 g Natriumazetat in 5 ml Wasser 0,75 g mit 10 ml Wasser gewaschenes Kristallpulver vom Schmp. 116°–117° lieferte. — Bei gelegentlichem Schütteln von 3 g *d*-Xylose-thiobenzhydrazid mit 21 ml 1-n. Salzsäure wurde nach 2 Tagen eine schwach trübe Lösung erhalten, welche nach Schwefelwasserstoff roch und von 5 g Natriumazetat in 10 ml Wasser emulgiert wurde, wonach ein viskoses Öl ausgeschieden wurde, welches nach Impfen mit Ausgangsmaterial in eine stark klebrige Kristallmasse überging.

Eine Lösung von 0,3266 g *d*-Xylose-thiobenzhydrazid in 10 ml 50 %-igem Alkohol ergab mit Phenolphthalein einen schnell verblassenden Umschlag für 1,65 ml 0,1000-n. Natronlauge, und nach je Δt Minuten wurden dann die folgenden Mengen Lauge verbraucht:

Δt :	10	5	10	10	10	10	10	10	20	60
ml:	0,80	0,60	0,40	0,40	0,40	0,40	0,30	0,25	0,25	0,20,
								Summe 5,65 ml;		

nach Zusatz von noch 6,86 ml der Lauge wurde die Lösung den folgenden Tag vorübergehend von 1,40 ml 0,1000-n. Salzsäure entfärbt, Äquiv.-Gew. ber. 284,3, gef. 294.

Eine Lösung wie oben, aber von 0,3193 g Sbst., verbrauchte unmittelbar 1,50 ml Lauge, und nach Zusätzen von je 0,50 ml der Lauge waren danach nach 0,5, 1, 1,5, 2,5, 4,5, 6,5, 8, 9, 10, 15 bzw. 50 Minuten Entfärbungen eingetreten. Nach Zusatz von noch 5,83 ml der Lauge wurden dann den folgenden Tag 1,70 ml der Salzsäure verbraucht, Äquiv.-Gew. 287; nach Zusätzen von je 0,50 ml der Säure traten nach 5, 12, 22, 35 bzw. ca. 200 Minuten wieder Rotfärbungen ein.

Eine Lösung von 0,3096 g des *d*-Xylose-thiobenzhydrazids in 11,90 ml 0,1000-n. Natronlauge verbrauchte gegen Phenolphthalein nach einer Stunde 1,55 ml 0,1000-n. Salzsäure, Äquiv.-Gew. 299, und nach je Δt Minuten wurden dann die folgenden Mengen der Säure verbraucht:

Δt :	2	3	5	10	20	40	60	120
ml:	0,25	0,15	0,15	0,20	0,30	0,30	0,30	0,25.

Gegen Metallsalze verhielt sich das *d*-Xylose-thiobenzhydrazid ungefähr wie das *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid.

3. *d*-Lyxose-thiobenzhydrazid

Beim Versetzen einer Lösung von 3 g *d*-Lyxose in 180 ml Wasser mit 3 g Thiobenzhydrazid in 20 ml 2-n. Salzsäure entstand ein schwach opaleszierendes Gemisch, welches nach einer halben Stunde Kristalle abzuscheiden begann und bis zum folgenden Tag 4,8 g mit 20 ml Wasser gewaschene, an der Luft getrocknete, schmale und flache Prismen lieferte. Diese schmolzen bei 167°–168° (Gasentwicklung), enthielten 11,26, ber. 11,28, % S und zeigten in Pyridin $[\alpha]_D^{20} = +19^{\circ},0$. — Aus 2 g *d*-Lyxose in 10 ml Wasser und der gleichen Menge Thiobenzhydrazid in 10 ml Alkohol wurde ein homogenes Gemisch erhalten, welches nach ca. 10 Minuten zu kristallisieren begann und dann schnell in einen Brei aus schmalen Schuppen oder

dünnen Täfelchen übergieng. Das Produkt wurde den folgenden Tag abgesaugt, mit 10 ml 50 %-igem Alkohol gewaschen und an der Luft getrocknet, wonach es 3,5 g wog, bei 169°–170° schmolz und in Pyridin sogleich und nach 2 Stunden $[\alpha]_D^{20} = +18^\circ.7$ zeigte. Beim Umkristallisieren von 2,8 g dieses Produktes aus 75 ml gew. Alkohol wurden 2,4 g seidenglänzende, flache Prismen vom Schmp. 170°–171° erhalten.

Für $C_{12}H_{16}O_4N_2S$ (284,33):

ber.: C 50,69,	H 5,67,	N 9,85,	S 11,28 %,
gef.: C 50,85,	H 5,71,	N 9,82,	S 11,27 %.

Eine Lösung von 0,5064 g des umkristallisierten Produktes in Pyridin zu 10,04 ml zeigte $\alpha_D^{20} = +0^\circ.95$, $[\alpha]_D^{20} = +18^\circ.8$ und $[M]_D^{20} = +53^\circ.4$; 0,5167 g davon in 2,00 (ber. 1,82) ml 1,00-n. Natronlauge und Wasser zu 10,04 ml gelöst zeigten 80 Minuten nach dem Zusatz der Lauge $\alpha_D^{20} = +0^\circ.57$ und darauf nach noch 10, 40 und 120 Minuten $\alpha_D^{20} = +0^\circ.60$, $[\alpha]_D^{20} = +11^\circ.7$ und $[M]_D^{20} = +33^\circ.3$.

Eine Lösung von 0,3042 g *d*-Lyxose-thiobenzhydrazid in 20 ml heissem, 50 %-igem Alkohol hielt sich beim Erkalten unverändert und ergab dann gegen Phenolphthalein einen schnell verblassenden Umschlag für 1,60 ml 0,1000-n. Natronlauge. Nach Zusatz von noch 10,40 ml der Lauge wurde die Lösung nach 10 Minuten von 2,20 ml 0,1000-n. Salzsäure vorübergehend farblos, Äquiv.-Gew. 310, und Zusätze von je 0,50 ml der Säure wurden dann nach 0,5, 0,5, 0,5, 0,5, 0,5, 0,5, 0,5, 1, 1 bzw. 2 Minuten verbraucht, worauf 10 Minuten nach einem weiteren Zusatz derselben Menge der Säure 0,50 ml der Lauge zur Rotfärbung nötig waren.

Eine wie oben bereitete Lösung von 0,3202 g des Thiohydrazids verbrauchte nach je Δt Minuten die folgenden Mengen 0,1000-n. Lauge:

Δt :	0	5	5	10	20	40	80	140	370	
ml:	2,20	1,20	0,90	0,80	0,60	0,60	0,35	0,35	0,30	Summe 7,30 ml,

und nach Zusatz von noch 4,80 ml der Lauge wurde die Lösung am folgenden Tag vorübergehend von 1,80 ml 0,1000-n. Säure entfärbt, Äquiv.-Gew. 311. Nach je Δt Minuten wurden dann die folgenden Mengen der Säure verbraucht:

Δt :	5	5	10	20	40	70	200	340
ml:	0,30	0,20	0,30	0,25	0,25	0,25	0,15	0,10.

Bei einem Versuch wie oben, aber mit 0,3020 g Thiobenzhydrazid, verbrauchte die Lösung sogleich 1,40 ml der Lauge, wonach nach Zusätzen von je 0,50 ml die Rotfärbung 0,5, 0,5, 1, 1,5, 2, 1,5, 1,5, 1,5, 1,5, 2, 5, 12, 15 bzw. 30 Minuten ersichtlich war. Nach Zugabe von noch 3,10 ml der Lauge und eine Stunde danach wurden 2,20 ml der Säure verbraucht, Äquiv.-Gew. 308, und weitere Zusätze von je 0,50 ml davon wurden so nach 1, 1, 1, 1, 1, 1,5, 2,5, 4 bzw. 60 Minuten verbraucht. Nach Zusatz von noch 0,50 ml der Säure war die Lösung nach 2 Stunden immer noch farblos, um durch 0,50 ml der Lauge rötlich gefärbt zu werden.

4. *d*-Ribose-thiobenzhydrazid

Bei Umsetzungen der *d*-Ribose mit Thiobenzhydrazid in Salzsäure wie bei der Xylose traten ähnliche Färbungen wie dort ein, aber hier gelang es nicht durch Abstumpfen der Säure mit Natriumacetat zu einheitlichen Produkten zu kommen.

— Als aber eine Lösung von 7,9 g der Ribose in 25 ml Wasser mit 8 g Thiobenzhydrazid in 25 ml Alkohol versetzt wurde, begannen nach ca. 45 Minuten Kristalle sichtbar zu werden und das Gemisch ging dann schnell in einen Brei aus fast haarfeinen Nadeln über. Diese wurden am folgenden Tag abgesaugt, mit 20 ml gew. Alkohol gewaschen und an der Luft getrocknet, wonach sie 13 g wogen, bei 139°–141° schmolzen, in Pyridin sogleich und nach 3 Stunden $[\alpha]_D^{20} = -26^{\circ},0$ zeigten und bei der Analyse ergaben:

Für $C_{12}H_{16}O_4N_2S$ (284,33):

ber.: C 50,69,	H 5,67,	N 9,85,	S 11,28 %,
gef.: C 50,65,	H 5,66,	N 9,80,	S 11,25 %.

Beim Umkristallisieren von 4 g des Rohproduktes aus 50 ml gew. Alkohol wurden 2,4 g mit 10 ml desselben Alkohols gewaschene Haare vom Schmp. 140°–141° erhalten. Von diesem Präparat zeigten 0,5028 g in Pyridin zu 10,04 ml gelöst $\alpha_D^{20} = -1^{\circ},32$, $[\alpha]_D^{20} = -26^{\circ},4$ und $[M]_D^{20} = -75^{\circ},1$. Eine Lösung von 0,5120 g davon in 1,80 + 0,18 ml 1,00-n. Natronlauge und Wasser zu 10,04 ml zeigte nach 18, 28 bzw. 58 Minuten $\alpha_D^{20} = \pm 0^{\circ},00$, $-0^{\circ},09$ und $-0^{\circ},23$, wonach die Drehung sich während 2 Stunden nicht mehr veränderte. Als Endwert des Drehungsvermögens erhält man somit $[\alpha]_D^{20} = -4^{\circ},5$, $[M]_D^{20} = -12^{\circ},8$.

Aus 3 g *d*-Ribose und 3,1 g Thiobenzhydrazid in 20 ml 1-n. Natronlauge wurde eine klare Lösung erhalten, welche nach 14 Stunden eine Spur eines graubraunen Schlammes abgeschieden hatte. Das Filtrat davon ging nach Zusatz von 2 g Essigsäure schnell in einen Brei aus nadelförmigen Prismen über, welche am folgenden Tag abgesaugt, mit 20 ml Wasser gewaschen und auf Tonscherben getrocknet wurden, wonach sie 3,2 g wogen, bei 137°–139° schmolzen und in Pyridin $[\alpha]_D^{20} = -25^{\circ},9$ zeigten.

Eine Lösung von 0,3044 g umkristallisiertem Ribose-thiobenzhydrazid in 20 ml heissem, 50 %-igem Alkohol hielt sich beim Erkalten unverändert und verbrauchte dann gegen Phenolphthalein nach je Δt Minuten:

Δt :	0	5	5	10	20	40	80	160
ml:	3,80	2,00	1,00	0,60	0,40	0,30	0,10	0,00,

Summe 8,20 ml 0,1000-n. Natronlauge; nach Zusatz von noch 4,75 ml der Lauge wurde sie am folgenden Tag vorübergehend durch 3,30 ml 0,1000-n. Salzsäure entfärbt, Äquiv.-Gew. 315. Nach je Δt Minuten wurden dann die folgenden Mengen der Säure verbraucht:

Δt :	5	5	10	20	40	70	215	335
ml:	0,30	0,30	0,30	0,20	0,20	0,15	0,15	0,05.

Eine wie oben bereitete Lösung von 0,3003 g des Thiohydrazids verbrauchte sogleich 3,80 ml der Lauge, und nach Zusätzen von je 0,50 ml davon verblieb die Färbung 1, 1, 1, 1, 1, 2, 4, 6, 10 bzw. 30 Minuten sichtbar. Nach Zufügen von noch 3,20 ml der Lauge wurde die Lösung nach 90 Minuten durch 2,50 ml der Salzsäure entfärbt, Äquiv.-Gew. 316.

5. *l*-Rhamnose-thiobenzhydrazid

Beim Versetzen einer Lösung von 3,65 g *l*-Rhamnose in 15 ml Wasser mit 3,05 g Thiobenzhydrazid in 15 ml 2-n. Salzsäure entstand ein opaleszierendes Gemisch,

welches schnell klar wurde und nach 3 bzw. 5 Minuten $\alpha_D^{20} = -0^\circ,70$ und $-1^\circ,95$ zeigte, wonach es durch Ausscheidung von kleinen Bällen aus prismatischen Kriställchen getrübt wurde. Das am folgenden Tag abgesaugte, mit 20 ml Wasser gewaschene und an der Luft getrocknete Reaktionsprodukt wog 5,2 g, schmolz unter Gasentwicklung bei 174° – 175° und zeigte in Pyridin sogleich und nach 3 Stunden $[\alpha]_D^{20} = -11^\circ,1$. Beim Umkristallisieren von 3 g aus 50 ml gew. Alkohol wurden 2,35 g weisse Haare vom Schmp. 175° – 176° erhalten.

Für $C_{13}H_{18}O_4N_2S$ (298,35):

ber.: C 52,33, H 6,08, N 9,39, S 10,75 %,
gef.: C 52,45, H 6,03, N 9,51, S 10,85 %.

Von dem umkristallisierten Produkt zeigten 0,5170 g in Pyridin zu 10,04 ml gelöst $\alpha_D^{20} = -0^\circ,56$, $[\alpha]_D^{20} = -10^\circ,9$ und $[M]_D^{20} = -32^\circ,5$. — Eine Lösung von 0,5137 g der Subst. in 1,89 (ber. 1,72) ml 1,00-n. Natronlauge und Wasser zu 10,04 ml zeigte nach 45 Minuten $\alpha_D^{20} = -0^\circ,58$ und nach 75 und 105 Minuten $\alpha_D^{20} = -0^\circ,52$, $[\alpha]_D^{20} = -10^\circ,2$ und $[M]_D^{20} = -30^\circ,4$.

Aus 3,65 g *l*-Rhamnose in 15 ml Wasser und 3,05 g Thiobenzhydrazid in 15 ml Alkohol wurde ein klares Gemisch erhalten, welches nach *t* Minuten die folgenden Drehungen zeigte:

<i>t</i> :	2	4	8	15	30
α_D^{20} :	$+0^\circ,67$	$+0^\circ,50$	$+0^\circ,20$	$-0^\circ,13$	$-0^\circ,76$

wonach Kristallisation begann; am folgenden Tag wurden 5,7 g sehr kleine, mit 20 ml 50 %-igem, gew. Alkohol gewaschene und auf Tonscherben getrocknete, nadelförmige Prismen erhalten, welche bei 175° – 176° schmolzen und in Pyridin $[\alpha]_D^{20} = -10^\circ,3$ zeigten. — Aus denselben Mengen Rhamnose in 15 ml Wasser und Thiobenzhydrazid in 20 ml 1-n. Natronlauge wurde eine Lösung erhalten, welche nach *t* Minuten die folgenden Drehungen zeigte:

<i>t</i> :	5	40	150	410	1 230	2 760	4 260
α_D^{20} :	$+0^\circ,92$	$+0^\circ,72$	$+0^\circ,32$	$-0^\circ,16$	$-0^\circ,72$	$-1^\circ,03$	$-1^\circ,11$

wonach sie mit 12 ml 2-n. Essigsäure ein klares Gemisch lieferte, welches sich bald zu trüben begann und bis zum folgenden Tag 5,2 g eines undeutlich kristallinischen Pulvers ausschied. Dieses schmolz bei 174° – 175° und zeigte in Pyridin $[\alpha]_D^{20} = -10^\circ,9$. — Bei einem neuen Versuch wurde wie bei der Arabinose festgestellt, dass die Umsetzung nach 24 Stunden beendet war; die Ausbeute betrug hier auch 5,7 g, der Schmp. war 174° – 175° und $[\alpha]_D^{20} = -11^\circ,0$.

Nach 1-stündigem Schütteln von 3,0 g *l*-Rhamnose-thiobenzhydrazid mit 20 ml 1-n. Salzsäure waren 2,75 g vom Schmp. wie vorher ungelöst verblieben; das Filtrat davon ergab mit 5 g Natriumazetat in 10 ml Wasser nur eine Spur eines graufarbenen Pulvers.

Eine Lösung von 0,3266 g *l*-Rhamnose-thiobenzhydrazid in 12,12 ml 0,1000-n. Natronlauge ergab mit Phenolphthalein eine schnell vorübergehende Entfärbung für 1,50 ml 0,1000-n. Salzsäure, Äquiv.-Gew. 308. — Als eine wie gewöhnlich aus 0,3166 g des Thiohydrazids und 20 ml 50 %-igem Alkohol bereitete Lösung mit demselben Indikator und derselben Lauge versetzt wurde, trat eine schnell verblässende Rotfärbung für 2,30 ml der Lauge ein, und nach je Δt Minuten wurden dann die folgenden Mengen davon verbraucht:

Δt :	10	5	10	10	10	10	10	10	20	60	
ml:	1,30	1,00	0,75	0,60	0,55	0,50	0,40	0,30	0,20	0,20	Summe 8,10 ml;

nach Zusatz von noch 3,58 ml der Lauge wurde das Gemisch nach einer Stunde von 1,70 ml der Salzsäure vorübergehend entfärbt, Äquiv.-Gew. 317. Nach je Δt Minuten wurden dann weiter die folgenden Mengen der Säure verbraucht:

Δt :	5	10	20	30	50
ml:	0,20	0,25	0,15	0,08	0,08.

Eine Lösung von 0,3260 g des Thiohydrazids in Alkohol-Wasser wie oben verbrauchte momentan 2,25 ml Lauge, und Zusätze von je 0,50 ml davon wurden in 0,5–1 Min. verbraucht, bis insgesamt noch 6,00 ml hinzugefügt waren, wonach die von den beiden folgenden Zusätzen hervorgerufenen Färbungen 2 bzw. mehr als 60 Minuten sichtbar verblieben. Mit noch 2,95 ml der Lauge versetzt, verbrauchte die Lösung dann nach 12 Stunden 2,00 ml der Salzsäure, Äquiv.-Gew. 320. Nach Zusatz von 0,50 ml der Säure trat dann nach 6 Minuten Rotfärbung ein, aber mit noch der gleichen Menge Säure versetzt war sie noch nach 2 Stunden nicht rot geworden.

Gegen Metallsalze verhielt sich das *l*-Rhamnose-thiobenzhydrazid ungefähr wie das *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid.

6. *d*-Glucose-thiobenzhydrazid

Beim Versetzen einer Lösung von 3,6 g *d*-Glucose in 15 ml Wasser mit 3,05 g Thiobenzhydrazid in 15 ml 2-n. Salzsäure entstand ein schwach milchiges Gemisch, welches bald klar wurde und dann 4 bzw. 7 Minuten nach der Mischung $0,5 \alpha_D^{20} = +2^\circ,12$ und $+1^\circ,57$ zeigte, wonach Kristallisation begann und ein Brei aus farblosen, mikroskopischen Prismen erhalten wurde. Das am folgenden Tag abgesaugte, mit 20 ml Wasser gewaschene und an der Luft getrocknete Reaktionsprodukt wog 5,8 g, schmolz unter Gelbfärbung und Gasentwicklung bei 183° – 184° und zeigte in Pyridin sogleich und nach 2 Stunden $[\alpha]_D^{20} = -42^\circ,7$.

Für $C_{13}H_{18}O_5N_2S$ (314,35):

ber.:	C 49,67,	H 5,77,	N 8,91,	S 10,20 %,
gef.:	C 49,62,	H 5,76,	N 8,97,	S 10,12 %.

Beim Versetzen von 3,6 g *d*-Glucose in 15 ml Wasser mit 3,05 g Thiobenzhydrazid in 15 ml Alkohol entstand eine klare Lösung, welche nach t Minuten die folgenden Drehungen zeigte:

t :	3	13	38	80
$0,5 \alpha_D^{20}$:	$+2^\circ,83$	$+2^\circ,66$	$+2^\circ,38$	$+1^\circ,98$,

wonach Kristallisation begann und bis zum folgenden Tag 5,0 g schmale Täfelchen oder flache Prismen vom Schmp. 182° – 183° und $[\alpha]_D^{20} = -43^\circ,6$ (in Pyridin) ausgeschieden wurden. — Aus einem Gemisch von 3,6 g *d*-Glucose in 15 ml Wasser und 3,05 g Thiobenzhydrazid in 20 ml 1-n. Natronlauge genommene Proben wurden erst nach 3 Tagen nicht mehr unmittelbar von verdünnter Essigsäure emulgiert; als das Gemisch dann mit 12 ml 2-n. Essigsäure versetzt wurde, schied es schnell 5,1 g mikroskopische, dünne Täfelchen vom Schmp. 182° – 183° und $[\alpha]_D^{20} = -43^\circ,2$ aus.

Beim Schütteln von 2,0 g des rohen *d*-Glucose-thiobenzhydrazids bei gewöhnlicher Temperatur mit 20 ml Pyridin entstand allmählich eine klare Lösung, welche nach Zusatz von 60 ml Wasser im Eisschrank 0,6 g farblose Schuppen vom Schmp. 183°–184° ausschied. Hiervon zeigten 0,5043 g in Pyridin zu 10,04 ml gelöst $\alpha_D^{20} = -2^\circ,11$, $[\alpha]_D^{20} = -42^\circ,0$ und $[M]_D^{20} = -132^\circ,0$. — Beim Erhitzen von 2,8 g des Thiohydrazids während 5 Minuten mit 100 ml gew. Alkohol lösten sich 1,3 g davon, und aus der Lösung kristallisierten beim Erkalten 1,0 g farblose Prismen vom Schmp. 183–184° aus. Dieses Präparat zeigte auch in Pyridin $[\alpha]_D^{20} = -42^\circ,0$, und als 0,5073 g davon mit 1,77 (ber. 1,61) ml 1,00-n. Natronlauge und Wasser zu 10,04 ml gelöst wurden, zeigte die Lösung 1/2 Stunde nach dem Zusatz der Lauge $[\alpha]_D^{20} = +1^\circ,00$ und dann nach 35 Minuten oder länger $\alpha_D^{20} = +0^\circ,97$, $[\alpha]_D^{20} = +19^\circ,2$ und $[M]_D^{20} = +60^\circ,4$.

Bei längerem Erhitzen von 1,5 g des *d*-Glucose-thiobenzhydrazids mit 75 ml gew. Alkohol trat praktisch vollständige Auflösung ein, aber die dann beim Erkalten abgeschiedenen Prismen schmolzen bei 181°–183° und zeigten in Pyridin $[\alpha]_D^{20} = -38^\circ,3$. — Bei 5 Minuten währendem Erhitzen von 2,4 g des Thiohydrazids mit 100 ml Wasser verblieben 0,5 g davon ungelöst; aus der Lösung wurden beim Erkalten 1,15 g fast nadelförmige Prismen vom Schmp. 183°–184° und $[\alpha]_D^{20} = -41^\circ,5$ (in Pyridin) ausgeschieden. — Nach 8-stündigem Erhitzen von 2 g des Thiohydrazids mit 100 ml Wasser waren 0,15 g glänzende Schuppen vom Schmp. des 2,5-Diphenyl-1,3,4-thiodiazols, 140°–142°, ausgeschieden; das Filtrat emulgierte sich beim Erkalten und lieferte dabei noch eine kleine Menge ähnlicher Schuppen.

Nach 1-stündigem Schütteln von 3,15 g *d*-Glucose-thiobenzhydrazid mit 20 ml 1-n. Salzsäure waren 3,0 g eines mit 10 ml Wasser gewaschenen Pulvers vom Schmp. 181°–183° ungelöst verblieben, und das Filtrat davon ergab mit 5 g Natriumazetat nur Opaleszenz und dann Spuren von Kristallflocken.

Eine von 0,3466 g *d*-Glucose-thiobenzhydrazid und 12,52 ml 0,1000-n. Natronlauge bereitete und mit Phenolphthalein versetzte Lösung wurde vorübergehend von 1,75 ml 0,1000-n. Salzsäure entfärbt, Äquiv.-Gew. 322. Nach je Δt Minuten wurden dann noch die folgenden Mengen Säure verbraucht:

Δt :	10	5	10	10	20	30	70	300
ml:	0,20	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,08.

Eine auch nach dem Erkalten klare Lösung von 0,3563 g *d*-Glucose-thiobenzhydrazid in 20 ml 50 %-igem Alkohol ergab mit Phenolphthalein einen schnell verblassenden Umschlag für 4,80 ml 0,1000-n. Natronlauge; nach je Δt Minuten wurden dann die folgenden Mengen der Lauge weiter verbraucht:

Δt :	2	3	5	10	20	40	60	300
ml:	0,80	0,60	0,65	0,85	0,90	0,70	0,55	0,35.

Nach Zusatz von noch 2,60 ml der Lauge wurde dann die Lösung den folgenden Tag vorübergehend durch 1,80 ml 0,1000-n. Salzsäure entfärbt, Äquiv.-Gew. = 324. Die Rotfärbung trat jedoch bald wieder ein, und nach 5 Minuten wurden 0,10 ml und dann nach noch 60 Minuten 0,06 ml der Säure verbraucht.

Von 0,3378 g des Thiohydrazids in 20 ml 50 %-igem Alkohol wurden gegen Phenolphthalein momentan 4,70 ml der Lauge verbraucht, und nach Zusätzen von je 0,50 ml Lauge traten dann Entfärbungen nach 0,5, 1, 1, 1,5, 1,5, 2, 2, 2,5, 3,5 bzw. 8 Minuten ein. Die von den nächsten 0,50 ml Lauge hervorgerufene Rotfärbung war noch nach einer Stunde sichtbar; nach nochmaligem Zusatz von 2,12 ml Lauge

wurde die Lösung den folgenden Tag vorübergehend durch 1,85 ml der Salzsäure entfärbt, Äquiv.-Gew. = 323. Nach Zusatz von noch 0,50 ml der Säure hielt sich die Lösung bis zum folgenden Tag farblos, und Rosafärbung trat dann für 0,08 ml der Lauge ein.

Proben einer wie bei dem *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid bereiteten Lösung des *d*-Glucose-thiobenzhydrazids in 0,5-n. Natronlauge ergaben keine Fällungen mit Lösungen von Ca-, Sr-, Ba- oder Mg-Salzen. Mit Salzen von Schwermetallen lieferten sie:

mit *Zinksulfat*: gelbe Lösung, welche schnell milchig wurde und bis zum folgenden Tag ein weisses, feinkörniges Pulver ausschied;

mit *Cadmiumsulfat*: eine allmählich nur schwach milchig werdende Lösung, welche den nächsten Tag nur eine unbedeutende Menge eines rosafarbenen Pulvers ausgeschieden hatte;

mit *Quecksilberchlorid*: eine gelbliche Lösung, welche nach ein Paar Stunden getrübt war und bis zum folgenden Tag eine teigige Masse nebst einem äusserst feinkörnigen Pulver absetzte;

mit *Kupfersulfat*: eine grünschwarze Lösung, welche bald schwarzbraun wurde und teerige Massen ausschied;

mit *Silbernitrat*: eine weisse, käsige Fällung, welche allmählich in eine teigige, braunschwarze Masse überging;

mit *Bleiazetat*: eine gelbe Lösung, welche sich allmählich emulgierte und ein zum Schluss braunschwarzes Pulver ausschied;

mit *Mangansulfat*: eine schwach gelbliche Lösung, welche bald milchig wurde und ein lachsfarbenes, körniges Pulver absetzte;

mit *Eisenchlorid*: ein dunkelgrünes, bald schwarzbraunes Gemisch, aus dem allmählich ein graugrünes, kristallinisches Pulver ausgeschieden wurde;

mit *Kobaltchlorür*: eine dunkelrotbraune Lösung, welche ein braunrotes, amorphes Pulver ausschied;

mit *Nickelsulfat*: eine braungelbe, käsige Fällung, welche allmählich feinkristallinisch wurde. — Die aus 10 ml der Thiohydrazid-Lösung und der gleichen Menge 0,5-n. Nickelsulfatlösung erhaltene Fällung bestand am folgenden Tag aus kleinen, nadelförmigen Prismen, welche nach Abfiltrieren, gründlichem Waschen mit Wasser und Trocknen an der Luft 1,0 g wogen und bei ca. 110°–112° in eine schwarze, halbflüssige, bei 114° aufschäumende Masse überging. Im Vakuum über Phosphorsäureanhydrid verlor das Salz 4,90 %, für 2 H₂O ber. 4,99 %, an Gewicht und ergab dann:

Für C₂₆H₃₄O₁₀N₄S₂Ni (685,37):

ber.: N 8,18,	S 9,36,	Ni 8,56 %,
gef.: N 8,17,	S 9,36,	Ni 8,70 %.

7. *d*-Mannose-thiobenzhydrazid

Beim Versetzen einer Lösung von 3,6 g *d*-Mannose in 15 ml Wasser mit 3,05 g Thiobenzhydrazid in 15 ml 2-n. Salzsäure entstand ein opaleszierendes Gemisch, welches schnell ein aus schmalen Prismen bestehendes Pulver abzuscheiden begann. Das am folgenden Tag abgesaugte, mit 30 ml Wasser gewaschene und an der Luft getrocknete Produkt wog 6,0 g und schmolz unter Gasentwicklung nach Sinterung und Braungelbfärbung bei 191°–193°.

Für $C_{13}H_{18}O_5N_2S$ (314,35):

ber.: C 49,67, H 5,77, N 8,91, S 10,20 %,
 gef.: C 49,57, H 5,81, N 8,90, S 10,12 %.

Nach eintägiger Behandlung von 0,3557 g *d*-Mannose-thiobenzhydrazid mit 20,0 ml Pyridin waren 0,1422 g davon ungelöst und also 0,2135 g in Lösung gegangen. Die Lösung zeigte $2\alpha_D^{20} = +0^\circ,34$, $[\alpha]_D^{20} = +15^\circ,9$. — Nach Behandlung von 0,5040 g desselben Thiohydrazids mit 1,77 (ber. 1, 60) ml 1,00-n. Natronlauge und etwas Wasser wurde erst nach einer Stunde eine klare Lösung erhalten, welche nach Zusatz von Wasser zu 10,04 ml und auch 2 Stunden später $\alpha_D^{20} = +1^\circ,00$, $[\alpha]_D^{20} = +19^\circ,9$ und $[M]_D^{20} = +62^\circ,6$ zeigte.

Aus 3,6 g *d*-Mannose in 15 ml Wasser und 3,05 g Thiobenzhydrazid in 15 ml Alkohol wurde ein klares Gemisch erhalten, welches nach einigen Minuten opaleszent geworden war und dann schnell ein feinkristallinisches Pulver ausschied. Dieses wurde den nächsten Tag abgesaugt, mit 20 ml 50 %-igem Alkohol gewaschen und an der Luft getrocknet, wonach es 6,05 g wog, wie oben bei 192° – 193° schmolz und in Pyridin $[\alpha]_D^{20} = +16^\circ,2$, $[M]_D^{20} = +50^\circ,9$ zeigte. — Beim Versetzen einer Lösung von 3,6 g *d*-Mannose in 15 ml Wasser mit 3,05 g Thiobenzhydrazid in 20 ml 1-n. Natronlauge entstand eine klare Lösung, welche nach *t* Minuten die folgenden Drehungen zeigte:

<i>t</i> :	5	10	35	150	400	760	1 480	2 200
α_D^{20} :	$+1^\circ,24$	$+1^\circ,24$	$+1^\circ,24$	$+1^\circ,34$	$+1^\circ,54$	$+1^\circ,94$	$+2^\circ,14$	$+2^\circ,14$.

Als die Lösung dann mit 12 ml 2-n. Essigsäure versetzt wurde, entstand ein homogenes Gemisch, welches schnell 5,4 g kleine, kurze und dicke Prismen vom Schmp. 191° – 192° und (in Pyridin) von $[\alpha]_D^{20} = +15^\circ,7$ ausschied. — Bei einem neuen Versuch wurde wie bei der *l*-Arabinose gefunden, dass die Umsetzung nicht nach 10, wohl aber nach 24 Stunden beendet war; die Ausbeute usw. war hier dieselbe wie bei dem früheren Versuch.

Als 2 g *d*-Mannose-thiobenzhydrazid in der Wärme mit insgesamt 200 ml gew. Alkohol behandelt wurden, lösten sich nur 0,4 g davon, und aus der Lösung wurden beim Erkalten 0,2 g mikroskopische, viereckige Täfelchen vom Schmp. 193° – 194° ausgeschieden. — Beim Erwärmen von 3 g des Thiohydrazids auf dem Wasserbad mit 300 ml Wasser löste sich praktisch alles in 10 Minuten; aus der Lösung wurden beim Erkalten 0,8 g kleine, flache Prismen oder schmale Täfelchen ausgeschieden, welche bei 192° – 193° wie oben schmolzen und in Natronlauge $[\alpha]_D^{20} = +20^\circ,3$ zeigten.

Nach einstündigem Schütteln von 3,2 g *d*-Mannose-thiobenzhydrazid mit 20 ml 1-n. Salzsäure wurden 3,15 g ungelöstes Pulver vom Schmp. 193° – 194° zurückgewonnen; das Filtrat davon ergab mit 3 g Natriumazetat in 5 ml Wasser nur eine kaum merkbare Spur einer feinkristallinischen Fällung.

Eine Lösung von 0,3384 g *d*-Mannose-thiobenzhydrazid in 12,71 ml 0,1000-n. Natronlauge ergab mit Phenolphthalein und 3,80 ml 0,1000-n. Salzsäure eine vorübergehende Entfärbung, Äquiv.-Gew. = 380. Nach je Δt Minuten wurden dann die folgenden Mengen der Säure verbraucht:

Δt :	5	10	20	50	10	120
ml:	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20,

wobei die letzten Zusätze eine beginnende Trübung hervorriefen.

Eine Lösung von 0,3309 g des Thiohydrazids in 30 ml heissem, 50 %-igem Alkohol, welche beim Erkalten sich zu trüben begann, ergab dann eine schnell vorübergehende Rotfärbung mit Phenolphthalein und 7,60 ml derselben Lauge wie oben. Nach je Δt Minuten traten dieselben Erscheinungen mit folgenden Mengen der Lauge ein:

Δt :	1	2	5	15	60
ml:	0,70	0,40	0,20	0,15	0,10.

Nach weiteren 120 Minuten war dann die Lösung schwach rosa gefärbt und nach Zusatz von 3,20 ml der Lauge wurde sie den folgenden Tag durch 2,20 ml 0,1000-n. Salzsäure entfärbt, Äquiv.-Gew. = 326. Die Rotfärbung kehrte jedoch allmählich wieder zurück und nach je Δt Minuten wurden weiter die folgenden Mengen der Säure verbraucht:

Δt :	5	10	20	50
ml:	0,20	0,20	0,15	0,10.

Eine Lösung von 0,3424 g des Thiohydrazids in 40 ml 50 %-igem Alkohol verbrauchte wie oben 7,00 ml der Lauge, und Zusätze von je 0,50 ml davon wurden dann in 1/4, 1/2, 1 bzw. 10 Minuten verbraucht, wonach die von den nächsten 0,50 ml hervorgerufene Färbung noch nach 2 Stunden sichtbar war. Nach Zusatz von noch 2,92 ml der Lauge wurde die Lösung den folgenden Tag vorübergehend durch 2,00 ml der Salzsäure entfärbt, Äquiv.-Gew. = 329. Von der Säure wurden dann 0,50 ml in 10 Minuten verbraucht, während die Lösung nach neuerlichem Zusatz von derselben Menge Säure noch nach 7 Stunden farblos war und dann durch 0,15 ml der Lauge gerötet wurde.

Proben einer Lösung des *d*-Mannose-thiobenzhydrazids in 0,5-n. Natronlauge wurden nicht von Ca-, Sr-, Ba- oder Mg-Salzlösungen gefällt. Dagegen gaben sie:

mit *Zinksulfat*: bald Emulgierung und dann allmählich ein feinkörniges, rötlich verfärbtes Pulver;

mit *Cadmiumsulfat*: ein homogenes Gemisch, welches den folgenden Tag ein wenig rotbraunes, zusammengesintertes Pulver abgeschieden hatte;

mit *Quecksilberchlorid*: eine gelbliche Lösung, welche in einen Brei eines schwach gelblichen Pulvers überging, das am folgenden Tag rot geworden war und aus kleinen, runden Körnchen nebst nadelförmigen Prismen bestand;

mit *Kupfersulfat*: grünscharze Fällung, den folgenden Tag aus braunschwarzen Aggregaten von runden Körnchen bestehend;

mit *Silbernitrat*: eine weisse, käsige Fällung, welche allmählich gelbbraun, den folgenden Tag braunschwarz geworden war und dann aus zusammengesinterten Massen von runden, undeutlich kristallinischen Körnchen bestand;

mit *Bleiazetat*: eine gelbe Lösung, welche bald farblos wurde und ein äusserst feinkörniges, den nächsten Tag braunschwarzes Pulver ausschied;

mit *Mangansulfat*: eine Lösung, welche bald milchig wurde und ein korkfarbenes Pulver ausschied;

mit *Eisenchlorid*: eine teigige, grünscharze Fällung, welche den folgenden Tag teilweise aus einem kristallinischen Pulver bestand;

mit *Kobaltchlorür*: eine graubraune Fällung, welche den folgenden Tag aus äusserst kleinen Körnchen bestand;

mit *Nickelsulfat*: eine braungelbe Fällung, welche bis zum folgenden Tag in zusammengesinterte Massen aus sehr kleinen Körnchen überging.

8. *d*-Galaktose-thiobenzhydrazid

Beim Versetzen einer Lösung von 3,6 g *d*-Galaktose in 15 ml Wasser mit 3,05 g Thiobenzhydrazid in 15 ml 2-n. Salzsäure entstand ein opaleszierendes Gemisch, welches sich zuerst klärte, um dann bald wieder opaleszierend zu werden und ein weisses Pulver aus mikroskopischen Sphärokristallen abzuscheiden. Das am folgenden Tag abgesaugte, mit Wasser gewaschene und an der Luft getrocknete Produkt wog 6,0 g, schmolz unter Gasentwicklung nach etwas Sinterung und Braungelbfärbung bei 175°–176°, zeigte in Pyridin $[\alpha]_D^{20} = -37^{\circ},5$ und ergab bei der Analyse: Für $C_{13}H_{18}O_5N_2S$ (314,35):

ber.: C 49,67, H 5,77, N 8,91, S 10,20 %,
gef.: C 49,57, H 5,77, N 8,96, S 10,19 %.

Aus einer Galaktose-Lösung wie oben und 3,05 g Thiobenzhydrazid in 15 ml Alkohol wurde ein klares Gemisch erhalten, welches nach *t* Minuten die folgenden Drehungen zeigte:

<i>t</i> :	3	5	10	20	40	75	135
0,5 α_D^{20} :	+8°,27	+7°,92	+7°,57	+6°,85	+5°,52	+3°,74	+1°,87.

Wegen eintretender Trübung konnten die Drehungsbestimmungen nicht mehr fortgesetzt werden, und den folgenden Tag wurden beim Absaugen usw. 6,0 g eines aus farblosen, rechteckigen Täfelchen bestehenden Pulvers gewonnen, welches wie oben bei 178°–179° schmolz und in Pyridin $[\alpha]_D^{20} = -37^{\circ},7$ zeigte. — Als andererseits eine Galaktose-Lösung wie oben mit 3,05 g Thiobenzhydrazid in 20 ml 1-n. Natronlauge versetzt worden war, zeigte das klare Gemisch nach *t* Minuten:

<i>t</i> :	5	20	80	390	750	1 500	2 160	3 000
0,5 α_D^{20} :	+3°,72	+3°,47	+3°,07	+2°,88	+2°,70	+2°,57	+2°,52	+2°,52,

wonach es mit 15 ml 2-n. Essigsäure ein homogenes Gemisch ergab. Dieses schied bis zum folgenden Tag 5,8 g Bälle aus flachen Prismen oder schmalen Täfelchen aus, welche bei 177°–178° wie oben schmolzen und in Pyridin $[\alpha]_D^{20} = -38^{\circ},0$ zeigten. — Als bei einem neuen Versuch Proben des Reaktionsgemisches mit verdünnter Essigsäure versetzt wurden, wurde nach 10, aber nicht mehr nach 24 Stunden unmittelbar Emulsion erhalten; mit 12 ml 2-n. Essigsäure lieferte dann das Gemisch 6,0 g Kristallpulver vom Schmp. 176°–177° wie oben und in Pyridin von $[\alpha]_D^{20} = -39^{\circ},0$.

Beim Erwärmen von 2,0 g des rohen *d*-Galaktose-thiobenzhydrazids mit 150 ml gew. Alkohol entstand leicht eine Lösung, welche beim Erkalten 1,5 g dünne, flache Prismen vom Schmp. 180°–181° (wie oben) ausschied. Von diesem Präparat zeigten 0,5016 g in Pyridin zu 10,04 ml gelöst sofort und nach 2 Stunden $\alpha_D^{20} = -2^{\circ},01$, $[\alpha]_D^{20} = -40^{\circ},2$ und $[M]_D^{20} = -126^{\circ},4$. — 0,5118 g Sbst. in 1,79, ber. 1,63, ml 1,00-n. Natronlauge und Wasser zu 10,04 ml gelöst zeigten 2 Stunden nach dem Zusatz der Lauge $\alpha_D^{20} = +1^{\circ},55$; nach noch einer Stunde und später war die Drehung $\alpha_D^{20} = +1^{\circ},58$, $[\alpha]_D^{20} = +31^{\circ},0$ und $[M]_D^{20} = +97^{\circ},4$.

Nach einstündigem Schütteln von 3,15 g *d*-Galaktose-thiobenzhydrazid mit 20 ml 1-n. Salzsäure waren 2,7 g davon vom Schmp. 172°–173° ungelöst verblieben; das Filtrat davon nebst 10 ml Waschwasser wurde durch 3 g Natriumazetat in 10 ml

Wasser schwach getrübt und schied dann 0,2 g Bälle aus nadelförmigen Prismen vom Schmp. 162°–164° aus.

Eine Lösung von 0,3310 g *d*-Galaktose-thiobenzhydrazid in 12,24 ml 0,1000-n. Natronlauge wurde nach Zusatz von Phenolphthalein vorübergehend durch 2,05 ml 0,1000-n. Salzsäure entfärbt, Äquiv.-Gew. = 325. Nach je Δt Minuten wurden noch die folgenden Mengen der Säure verbraucht:

Δt :	5	10	20	40	80	90	180
ml:	0,30	0,20	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15.

Die Lösung trübte sich hierbei allmählich und schied zum Schluss eine Spur einer feinkörnigen Fällung aus.

Beim Erwärmen von 0,3355 g des Thiohydrazids mit 20 ml 50 %-igem Alkohol entstand eine Lösung, welche beim Erkalten homogen verblieb und dann einen schnell verblassenden Phenolphthalein-Umschlag mit 3,65 ml der Natronlauge lieferte. Nach je Δt Minuten wurden dann weiter die folgenden Mengen derselben Lauge verbraucht:

Δt :	2	3	5	10	20	40	60	100	200	300
ml:	0,50	0,50	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40,

und nach dem Zusatz von weiteren 4,80 ml Lauge wurde die Lösung den folgenden Tag durch 2,80 ml Salzsäure vorübergehend entfärbt, Äquiv.-Gew. 341. Nach je Δt Minuten wurden dann noch die folgenden Mengen Säure verbraucht:

Δt :	5	10	20	80
ml:	0,35	0,25	0,15	0,15.

Eine Lösung von 0,3315 g des Thiohydrazids in verd. Alkohol wie oben verbrauchte wie dort momentan 3,70 ml Lauge; und Portionen von je 0,50 ml davon wurden dann nach 0,5, 1, 2, 5, 15, 30 bzw. 70 Minuten weiter verbraucht. Nach Zusatz von noch 5,15 ml Lauge wurde die Lösung den folgenden Tag durch 2,90 ml 0,1000-n. Salzsäure gelb gefärbt, Äquiv.-Gew. 351, und nach Zusatz von noch 0,50 ml davon wurde sie in 20 Minuten wieder rot, während neue 0,50 ml noch nach 4 Stunden nicht verbraucht waren.

Eine Lösung des *d*-Galaktose-thiobenzhydrazids in 0,5-n. Natronlauge lieferte mit Lösungen von Ca-, Sr-, Ba- oder Mg-Salzen keine Fällungen. Mit einigen anderen Metallsalzlösungen ergab sie:

mit *Zinksulfat*: eine Lösung, welche sich schnell emulgierte und ein weisses, feinkörniges Pulver ausschied;

mit *Cadmiumsulfat*: sogleich Emulgierung und danach Fällung eines weissen, feinkörnigen Pulvers, welches den folgenden Tag teilweise in rotgelbe, teigige Massen übergegangen war;

mit *Quecksilberchlorid*: gelbliche, käsige Fällung, den folgenden Tag aus einem cremefarbenen, amorphen, feinkörnigen Pulver bestehend;

mit *Kupfersulfat*: grünschwärze Lösung, welche bis zum folgenden Tag eine aus äusserst kleinen Körnchen bestehende, braune Fällung lieferte;

mit *Silbernitrat*: weisse, käsige Fällung, welche schnell grauschwarz wurde und bis zum folgenden Tag in eine zusammengesinterte, schwarze Masse überging;

mit *Bleiazetat*: eine gelbliche, gelatinös käsige Fällung, am folgenden Tag aus fast gelatinösen, braunschwarzen Massen von amorphen Körnchen bestehend;

mit *Mangansulfat*: Lösung, welche sich bald emulgierte und ein feinkörniges, korkfarbenes Pulver ausschied;

mit *Eisenchlorid*: violettbraunes, dann braunschwarzes Gemisch, welches den folgenden Tag ein grauweisses Pulver von kleinen Nadelchen oder Prismen ausgeschieden hatte;

mit *Kobaltchlorür*: graubraune, den folgenden Tag dunkelbraune Fällung von äusserst kleinen, runden Körnchen;

mit *Nickelsulfat*: wie mit dem Kobaltsalz, aber Fällung braungelb.

9. *d*-Fructose-thiobenzhydrazid

Eine Lösung von 3,6 g *d*-Fructose in 15 ml Wasser gab mit 3,05 g Thiobenzhydrazid in 15 ml 2-n. Salzsäure ein opaleszierendes Gemisch, welches sich schnell klärte und nach *t* Minuten die folgenden Drehungen zeigte:

<i>t</i> :	2	4	7	12	20	40	100
0,5 α_D^{20} :	-4°,43	-4°,04	-3°,68	-3°,26	-2°,93	-2°,70	-2°,60,

wonach es zu kristallisieren begann und bis zum folgenden Tag eine kompakte Masse von kleinen Prismen absetzte. Nach Zerdrücken, Absaugen, Waschen mit 10 ml Wasser und Trocknen an der Luft wog das so erhaltene Produkt 5,6 g, schmolz unter Gasentwicklung und nach Braunfärbung bei 175°–176° und zeigte in Pyridin sogleich und nach 2 Stunden $[\alpha]_D^{20} = +24°,1$.

Für $C_{13}H_{18}O_5N_2S$ (314,35):

ber.:	C 49,67,	H 5,77,	N 8,91,	S 10,20 %,
gef.:	C 49,68,	H 5,77,	N 8,85,	S 10,23 %.

Eine in der gleichen Weise aus 3,6 g *d*-Fructose in 15 ml Wasser und 3,05 g Thiobenzhydrazid in 15 ml Alkohol dargestellte Lösung zeigte nach *t* Minuten:

<i>t</i> :	2	7	22	120	350	640
0,5 α_D^{20} :	-4°,83	-4°,67	-4°,51	-4°,20	-3°,70	-3°,23.

Danach begann Kristallisation und bis zum folgenden Tag wurden 2,6 g kleine, flache, farblose Prismen vom Schmp. 167°–169° und $[\alpha]_D^{20} = +23°,6$ (in Pyridin) abgeschieden. Das mit 20 ml Wasser versetzte Filtrat ergab dann bei der freiwilligen Eindunstung noch 1,4 g ähnliche Kristalle vom Schmp. 173°–174° und (in Pyridin) von $[\alpha]_D^{20} = +24°,0$. — Eine aus 3,6 g *d*-Fructose in 15 ml Wasser und 3,05 g Thiobenzhydrazid in 20 ml 1-n. Natronlauge bereitete Lösung zeigte nach *t* Minuten:

<i>t</i> :	4	60	240	920	1 600	3 000
0,5 α_D^{20} :	-4°,20	-4°,03	-3°,98	-3°,86	-3°,78	-3°,78,

und beim Versetzen mit 1,5 g Eissigsäure trat dann Emulgierung ein und ein Öl wurde abgeschieden, welches nach einer Stunde zu 2,8 g einer Kristallmasse erstarrte. Das so erhaltene Produkt schmolz bei ca. 120°–126° und bestand gemäss der Analyse aus einem Gemisch von *d*-Fructose-thiobenzhydrazid und unverbrauchtem Thiobenzhydrazid:

Für $C_{13}H_{18}O_5N_2S + 1,3 C_7H_8N_2S$ (512,23):

ber.: C 51,82, H 5,59, N 12,58, S 14,40 %,
gef.: C 52,25, H 5,60, N 12,53, S 14,22 %.

Das sp. Drehungsvermögen des Produktes in Pyridin betrug $[\alpha]_D^{20} = +13^\circ,3$, woraus man für das darin eingehende Fructose-thiobenzhydrazid $[\alpha]_D^{20} = +22^\circ$ erhält. — Die Mutterlauge des zuerst erhaltenen Produktes schied bis zum folgenden Tag 1,2 g *d*-Fructose-thiobenzhydrazid vom Schmp. 170° – 172° und $[\alpha]_D^{20} = +23^\circ,3$ (in Pyridin) aus; aus dem Filtrat davon wurden beim freiwilligen Eindunsten noch 0,5 g derselben Verbindung als ein Kristallpulver vom Schmp. 167° – 169° und mit 8,92, ber. 8,91, % N und 10,28, ber. 10,20, % S erhalten. — Da also die Umsetzung der Fructose mit dem Thiobenzhydrazid in alkalischer Lösung nur langsam verläuft, wurde bei einem neuen Versuch wie vorher die Essigsäure erst nach 12 Tagen zugesetzt. Das dabei ausgeschiedene Öl ergab beim Ausrühren mit Wasser 2,3 g einer Kristallmasse vom Schmp. ca. 125° – 130° , während die davon abdekantierte Lösung allmählich 1,9 g Kristalle ausschied, welche beim Behandeln mit heissem Benzol 0,15 g an Gewicht verloren und dann bei 154° – 157° schmolzen, 50,28 % C, 5,82 % H, 8,87 % N und 10,31 % S enthielten und in Pyridin $[\alpha]_D^{20} = +10^\circ,0$ zeigten. Durch die längere Reaktionszeit wurde also nicht die Ausbeute verbessert, und die Umsetzung dürfte daher allmählich zum Stillstand gekommen sein. Ausserdem scheint das entstandene Thiohydrazid nicht eine zu lange andauernde Einwirkung des Alkalis zu vertragen.

Beim Erwärmen von 2,4 g rohen *d*-Fructose-thiobenzhydrazids mit 150 ml gew. Alkohol lösten sie sich im Verlaufe von 10 Minuten praktisch vollständig auf, und aus der Lösung wurden beim Erkalten 1,0 g Sternchen und Bälle aus nadelförmigen Prismen ausgeschieden. Dieses Produkt schmolz bei 174° – 175° ; 0,5099 g davon zeigten in Pyridin zu 10,04 ml gelöst $\alpha_D^{20} = +1^\circ,23$, $[\alpha]_D^{20} = +24^\circ,2$ und $[M]_D^{20} = +76^\circ,1$. — 0,5374 g derselben Subst. ergaben mit 1,88, ber. 1,71, ml 1,00-n. Natronlauge und Wasser zu 10,04 ml eine Lösung, welche *t* Minuten nach dem Zusatz der Lauge die folgenden Drehungen zeigte:

<i>t</i> :	38	45	75	200	320	500	700
α_D^{20} :	$-1^\circ,35$	$-1^\circ,53$	$-1^\circ,88$	$-2^\circ,33$	$-2^\circ,40$	$-2^\circ,43$	$-2^\circ,43$,

und als Endwert erhält man also $[\alpha]_D^{20} = -45^\circ,4$, $[M]_D^{20} = -142^\circ,7$.

Beim Erhitzen von 2,0 g des *d*-Fructose-thiobenzhydrazids 10 Minuten mit 40 ml Wasser lösten sich 0,85 g; aus der Lösung wurden beim Erkalten 0,55 g prismatische Kriställchen abgeschieden, welche bei 173° – 174° wie oben schmolzen und in Pyridin $[\alpha]_D^{20} = +24^\circ,4$ zeigten.

Nach einstündigem Schütteln von 3,15 g *d*-Fructose-thiobenzhydrazid mit 20 ml 1-n. Salzsäure wurden 2,95 g ungelöstes Material vom Schmp. 173° – 175° zurückgewonnen; das Filtrat davon lieferte mit 5 g Natriumazetat in 10 ml Wasser nur einen schwachen Bodenbelag.

Als eine mit Phenolphthalein versetzte Lösung von 0,3341 g *d*-Fructose-thiobenzhydrazid in 12,04 ml 0,1000-n. Natronlauge mit 0,1000-n. Salzsäure zurücktitriert wurde, trat mit 3,00 ml der Säure eine schnell vorübergehende Entfärbung ein, Äquiv.-Gew. = 370, und nach je Δt Minuten wurden die folgenden Mengen der Säure weiter verbraucht:

Δt :	10	5	10	10	20	30
ml:	0,80	0,50	0,40	0,30	0,30	0,30.

Eine Lösung von 0,3336 g des Thiohydrazids in 20 ml 50 %-igem Alkohol ergab einen schnell verblässenden Phenolphthalein-Umschlag für 7,72 ml der Lauge, und nach 2 Stunden wurden noch 0,20 ml davon verbraucht. Mit weiteren 4,26 ml Lauge versetzt, wurde die Lösung den nächsten Tag durch 2,55 ml der Salzsäure gelb gefärbt, Äquiv.-Gew. = 346, wonach sie nach 2, 3, 5 bzw. 180 Minuten noch 0,40, 0,30, 0,10 und 0,15 ml der Säure verbrauchte. — Bei einem neuen Versuch wurde die Lösung von 0,3398 g des Thiohydrazids in 20 ml 50 %-igem Alkohol momentan durch 8,00 ml der Lauge rot gefärbt und nach Zusatz von noch 0,50 ml der Lauge war die Färbung ca. 10 Stunden sichtbar. Nach Zusatz von 4,00 ml der Lauge verbrauchte sie dann den folgenden Tag 2,80 ml der Salzsäure, Äquiv.-Gew. = 350. Mit noch 0,50 ml der Säure war sie nach 40 Minuten rotgelb, und mit derselben Menge Säure wurde sie den folgenden Tag rotgelb für 0,20 ml der Lauge.

Proben einer Lösung des *d*-Fructose-thiobenzhydrazids in 0,5-n. Natronlauge ergaben keine Veränderungen mit Lösungen von Ca-, Sr-, Ba- oder Mg-Salzen. Mit Lösungen der folgenden Schwermetallsalze lieferten sie:

mit *Zinksulfat*: ein milchiges Gemisch, welches allmählich in einen gelatinösen, schwach rötlichen Brei aus äusserst kleinen, runden Körnchen überging;

mit *Cadmiumsulfat*: eine klare Lösung, welche nach ca. 5 Minuten emulgiert wurde und dann eine Fällung aus einem weissen, sehr feinkörnigen Pulver ergab;

mit *Quecksilberchlorid*: eine käsige, bald gelblich werdende Fällung, den folgenden Tag aus einem cremefarbenen, sehr feinkörnigen Pulver bestehend;

mit *Kupfersulfat*: dunkelgrüne Lösung und teigige Massen, bis zum folgenden Tag in ein braunschwarzes Pulver übergehend;

mit *Silbernitrat*: eine weisse, käsige Fällung, welche bald gelblich und den folgenden Tag braunschwarz geworden war;

mit *Bleiazetat*: schnell eine zuerst gelbliche, dann weisse und den nächsten Tag violettbraune, aus kleinen runden Körnchen bestehende Fällung;

mit *Mangansulfat*: eine gelbliche Lösung, welche sich bald emulgierte und in einen gelblichen Brei aus kleinen, runden Körnchen überging;

mit *Eisenchlorid*: violetttes Gemisch, welches bis zum folgenden Tag ein grau-weisses, teilweise kristallinisches Pulver ausschied;

mit *Kobaltchlorür*: eine braungelbe Fällung, den folgenden Tag aus einem gelatinösen, braunroten Brei aus äusserst kleinen, runden Körnchen bestehend;

mit *Nickelsulfat*: eine grüngelbe Fällung, welche den nächsten Tag aus einem gelatinösen, graugrünen Brei aus runden Körnchen bestand.

10. *l*-Sorbose-thiobenzhydrazid

Wegen langsamer Bildung und sogleich beginnender Zersetzung des Sorbose-thiobenzhydrazids lässt sich diese Verbindung nicht bequem in sauren oder alkalischen Lösungen darstellen. Besser gelingt dies indessen beim Arbeiten mit wässrig-alkoholischen Gemischen, wie aus dem folgenden Versuch hervorgeht: eine aus 7,2 g *l*-Sorbose in 25 ml Wasser und 6,1 g Thiobenzhydrazid in dem gleichen Volumen gew. Alkohol bereitete Reaktionslösung schied im Verlaufe von einer Woche 0,1 g kleiner Schuppen vom Schmp. 130°–135° aus, worauf das Filtrat davon im Laufe von 3 Tagen 5,4 g mit 10 ml 50 %-igem Alkohol gewaschene und zwischen Filtrierpapier gepresste, schmale und flache Prismen absetzte. Diese gingen bei ca. 65°–

70° in eine dickflüssige und kleinblasige Schmelze über und gaben bei der Analyse Werte, welche zeigten, dass sie sowohl Kristallalkohol wie Kristallwasser enthielten:

Für $C_{13}H_{18}O_5N_2S + 0,8 C_2H_5OH + 0,2 H_2O = C_{14,6}H_{23,2}O_6N_2S$ (354,81):

ber.: C 49,42, H 6,59, N 7,90, S 9,03 %,
gef.: C 48,92, H 6,67, N 7,73, S 8,95 %.

Eine Lösung von 0,5263 g des Produktes in Pyridin zu 10,04 ml zeigte sogleich und nach 2 Stunden $\alpha_D^{20} = +0^\circ,39$, $[\alpha]_D^{20} = +7^\circ,4$, bzw. für alkohol- und wasserfreie Probe $[\alpha]_D^{20} = +8^\circ,4$.

Beim Umkristallisieren von 4,4 g des obigen Produktes aus 25 ml abs. Alkohol wurden 3,9 g mit 5 ml desselben Alkohols gewaschene und wie oben getrocknete, fast nadelförmige Prismen erhalten, welche sowohl in offenem wie in zugeschmolzenem Röhrchen bei 68°–72° schmolzen und bei der Analyse ergaben:

Für $C_{13}H_{18}O_5N_2S + C_2H_5OH = C_{15}H_{24}O_6N_2S$ (360,42):

ber.: C 49,98, H 6,71, N 7,77, S 8,90 %,
gef.: C 50,01, H 6,76, N 7,76, S 8,86 %.

Von diesem Präparat zeigten 0,5667 g in Pyridin zu 10,04 ml gelöst $\alpha_D^{20} = +0^\circ,40$, $[\alpha]_D^{20} = +7^\circ,1$, bzw. für alkoholfreie Substanz $[\alpha]_D^{20} = +8^\circ,1$ und $[M]_D^{20} = +25^\circ,5$. — 0,6020 g Sbst. in 1,84, ber. 1,67, ml 1,00-n. Natronlauge und Wasser zu 10,04 ml gelöst zeigten t Minuten nach dem Zusatz der Lauge:

t :	20	25	30	40	60	100	180	340
α_D^{20} :	$-1^\circ,00$	$-1^\circ,28$	$-1^\circ,48$	$-1^\circ,84$	$-2^\circ,12$	$-2^\circ,16$	$-2^\circ,16$	$-2^\circ,16$

Als Endwert erhält man also $[\alpha]_D^{20} = -36^\circ,0$, bzw. für alkoholfreie Probe $[\alpha]_D^{20} = -41^\circ,3$ und $[M]_D^{20} = -129^\circ,8$.

Die Mutterlauge des obigen Rohproduktes ergab bei freiwilliger Eindunstung während 4 Tage einen Brei aus kleinen Prismen, welcher 29 g wog und beim Absaugen, Waschen mit 10 ml Wasser und Trocknen wie oben 5,3 g Kristalle vom Schmp. 67°–71° lieferte. Beim Umkristallisieren von 4,2 g davon aus 25 ml abs. Alkohol wurden 3,6 g nadelförmige Prismen erhalten, welche bei 70°–72° schmolzen, 49,61 % C und 6,72 % H, ber. 49,98 % C und 6,71 % H, enthielten und in Pyridin $[\alpha]_D^{20} = +7^\circ,2$, bzw. für alkoholfreie Probe $[\alpha]_D^{20} = +8^\circ,1$ zeigten.

An der Luft tauscht das alkoholhaltige Thiohydrazid allmählich den Alkohol gegen Wasser aus. Ein Präparat, das 2 Monate in dieser Weise aufbewahrt worden war, hatte dabei 7,13 % an Gewicht verloren und zeigte dann die Zusammensetzung:

Für $C_{13}H_{18}O_5N_2S + 0,2 C_2H_5OH + 0,8 H_2O = C_{13,4}H_{20,8}O_6N_2S$ (337,98):

ber.: C 47,62, H 6,20, N 8,29, S 9,49 %,
gef.: C 47,93, H 6,11, N 8,49, S 9,54 %.

Versuche durch Umkristallisieren des rohen oder aus abs. Alkohol kristallisierten *l*-Sorbose-thiobenzhydrazids aus Wasser zu einem kristallwasserhaltigen Präparat zu kommen, gelangen nicht, sondern es wurden nur klebrige Massen erhalten. Als dagegen 3,6 g eines Alkohol-Produktes mit 20 ml 0,5-n. Natronlauge eine halbe Stunde geschüttelt wurden, entstand eine schwach gelbliche Lösung, welche nach Zusatz von 10 ml 2-n. Salzsäure bis zum folgenden Tag 2 g schmale Prismen ausschied. Diese veränderten beim Liegen an der Luft nicht das Gewicht, schmolzen bei 66°–68° und ergaben bei der Analyse:

Für $C_{13}H_{18}O_5N_2S + H_2O = C_{13}H_{20}O_6N_2S$ (332,37):

ber.: C 46,97, H 6,07, N 8,43, S 9,65 %,
 gef.: C 46,99, H 6,02, N 8,46, S 9,66 %.

11. *d*-Sedoheptose-thiobenzhydrazid

Die von Professor NORDAL erhaltene, aus *Sedum spectabilis* gewonnene *d*-Sedoheptose bestand aus einer dunkelbraunen, zähen, sirupös gummiartigen Masse, welche weder in Salzsäure, Alkohol-Wasser oder Natronlauge mit Thiobenzhydrazid kristallisierte Umsetzungsprodukte lieferte. Ein glasiges Präparat, welches die Zusammensetzung eines Sedoheptose-thiobenzhydrazids zeigte, wurde jedoch zum Schluss als Eindunstungsrückstand nach Umsetzung der Komponenten in 50 %-igem Alkohol gewonnen. Hierbei wurde eine Lösung von 7 g der *d*-Sedoheptose in 20 ml Wasser mit 4,5 g Thiobenzhydrazid in 20 ml Alkohol versetzt, wobei ein homogenes Gemisch entstand. Nach einer Woche waren darin 0,1 g Kristallschuppen vom Schmp. 137°–139° ausgeschieden; das Filtrat davon lieferte bei freiwilliger Eindunstung auf 26 g Gewicht noch 0,1 g ähnlicher Schuppen vom Schmp. 140°–142°. Nach fortgesetzter Eindunstung der Mutterlauge auf 13 g eines gelbbraunen Syrups ergab dieser mit 100 ml abs. Alkohol in der Wärme etwas ungelöstes, an der Luft zu braunen Massen zerfließendes Pulver; das Filtrat davon setzte beim Erkalten einen unbedeutenden, glasig gummiartigen Bodenbelag ab. Die davon abdekantierte, gelbbraune Lösung wurde bei gelinder Wärme eingedunstet, wobei 11 g einer gelbbraunen, sirupösen Masse zurückblieben, welche mit 90 ml Wasser 0,25 g Schuppen vom Schmp. 139°–141° ungelöst zurückliessen. Das Filtrat davon war gelbbraun, nach Behandlung mit 1 g Norit (Carboraffin C) gelbgrün, und zeigte dann $\alpha_D^{20} = -0^{\circ},10$. Beim Eindunsten im Vakuum über Schwefelsäure ergab es noch 0,1 g Schuppen vom Schmp. 140°–142°. Das Filtrat davon dunstete dann im Vakuum über Phosphorsäureanhydrid zu 7,1 g eines gelblichen Glases ein, welches bei ca. 60°–85° schmolz, 2,1 % Asche enthielt und mit Korrektion hierfür bei der Analyse ergab:

Für $C_{14}H_{20}O_6N_2S$ (344,38):

ber.: C 48,82, H 5,85, N 8,14, S 9,31 %,
 gef.: C 48,90, H 5,88, N 8,23, S 9,32 %.

Von dem analysierten Präparat zeigten 0,5227 g in Pyridin zu 10,04 ml gelöst sofort und nach 2 und 7 Stunden $\alpha_D^{20} = +0^{\circ},78$, $[\alpha]_D^{20} = +15^{\circ},0$ und $[M]_D^{20} = +51^{\circ},7$. — 0,5418 g in 1,72, ber. 1,57, ml 1,00-n. Natronlauge und Wasser zu 10,04 ml gelöst zeigten t Minuten nach dem Zusatz der Lauge:

t :	25	30	45	65	105	185	375
α_D^{20} :	$-0^{\circ},03$	$-0^{\circ},05$	$-0^{\circ},09$	$-0^{\circ},14$	$-0^{\circ},23$	$-0^{\circ},27$	$-0^{\circ},27$.

Als Endwert bekommt man also $[\alpha]_D^{20} = -5^{\circ},0$, $[M]_D^{20} = -17^{\circ},2$.

Die aus dem Reaktionsgemisch ausgeschiedenen Schuppen vom Schmp. ca. 140° wurden vereinigt und aus Benzol umkristallisiert, wobei dünne Täfelchen vom Schmp. des 2,5-Diphenyl-1,3,4-thiodiazols, 142°–143°, und mit

ber.: N 11,76, S 13,46 %; gef.: N 11,69, S 14,03 %,

erhalten wurden.

III. Oxydationsprodukte der Zucker-thiobenzhydrazide

1. Oxydationsprodukte der Arabinose-thiobenzhydrazide

A. Luftoxydationen

Beim Versetzen einer Lösung von 3,0 g *l*-Arabinose in 185 ml Wasser mit 3,05 g Thiobenzhydrazid in 15 ml 2-n. Salzsäure entstand ein stark opaleszierendes Gemisch, welches bis zum folgenden Tag etwas schlammartiges Pulver und an der Oberfläche 0,3 g Aggregate aus kleinen Prismen vom Schmp. ca. 198°–200° (unter Zersetzung) ausschied. Das Filtrat lieferte dann während einer Woche in einer offenen Schale 2,8 g undeutlich kristallinische Krusten vom gleichen Schmp., welche beim Schütteln mit 30 ml 0,5-n. Natronlauge 2,4 g ungelöstes Material vom Schmp. 205°–207° ergaben, während aus der Lösung mit Essigsäure 0,2 g *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid vom Schmp. 165°–167° ausgefällt wurden. Das ungelöste Material wurde aus 240 ml gew. Alkohol umkristallisiert, wobei 1,5 g farblose, haarfeine Nadeln erhalten wurden. Diese gingen bei 213°–214° in eine gelbbraune, blasige Schmelze über und zeigten die Zusammensetzung eines Tetraoxybutyl-phenylthiodiazols.

Für $C_{12}H_{14}O_4N_2S$ (282,31):

ber.: C 51,05,	H 5,00,	N 9,92,	S 11,36 %,
gef.: C 51,10,	H 4,93,	N 9,86,	S 11,38 %.

Eine in gelinder Wärme dargestellte Lösung von 0,3792 g der analysierten Verbindung in Pyridin zu 10,04 ml gelöst zeigte $\alpha_D^{20} = +0^\circ,92$, $[\alpha]_D^{20} = +24^\circ,4$ und $[\eta]_D^{20} = +68^\circ,9$.

Wie bei dem obigen Versuch wurden aus 1,5 g *d*-Arabinose in 100 ml Wasser und 1,5 g Thiobenzhydrazid in 10 ml 2-n. Salzsäure nach 5 + 5 Tagen 1,7 + 0,35 = 2,05 g Kristallaggregate vom Schmp. ca. 195°–200° gewonnen. Beim Umkristallisieren aus 200 ml gew. Alkohol wurden hieraus 1,0 g farblose Nadelchen vom Schmp. 212°–214° erhalten, welche 51,05 % C und 5,00 % H enthielten und für 0,4450 g in Pyridin zu 10,04 ml gelöst $\alpha_D^{20} = -1^\circ,08$, $[\alpha]_D^{20} = -24^\circ,4$ und $[\eta]_D^{20} = -68^\circ,9$ zeigten.

Eine aus 0,75 g *d*- und der gleichen Menge *l*-Arabinose in 100 ml Wasser und 1,55 g Thiobenzhydrazid in 10 ml 2-n. Salzsäure bereitete, opaleszierende Lösung schied bis zum folgenden Tag 2,0 g *rac*-Arabinose-thiobenzhydrazid aus. Das Filtrat ergab dann beim Stehen an der Luft während einer Woche 0,5 g gelbliches Pulver vom Schmp. 190°–193°, nach dem Umkristallisieren aus 25 ml gew. Alkohol 0,35 g nadelförmige Prismen vom Schmp. 195°–197° (Zersetzung) und 51,01 % C sowie 4,97 % H enthaltend. — Dieselbe Verbindung wurde erhalten, als 0,2014 g 5-*d*-Arabinotetraoxybutyl-2-phenyl-1,3,4-thiodiazol und die gleiche Menge der *l*-Form zusammen in 25 ml heissem, gew. Alkohol gelöst wurden; beim Erkalten kristallisierten dann 0,3 g besenförmige Aggregate aus haarfeinen Nadeln aus, welche wie oben bei 195°–197° schmolzen und 51,24 % C und 4,94 % H enthielten.

B. Perhydroloxydationen

Bei Behandlung von *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid in saurer oder alkalischer Wasserlösung oder in 50 %-igem Alkohol mit Perhydrol traten heftige Reaktionen ein und es wurden meist klebrige Produkte gebildet, aus denen nur unbedeutende Mengen 2,5-Diphenyl-1,3,4-thiodiazol und 5-*l*-Arabinotetraoxybutyl-2-phenyl-1,3,4-thiodiazol isoliert werden konnten. — Beim Schütteln eines Gemisches von 2,9 g *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid mit 25 ml Azeton und 2 g Perhydrol entstand unter kaum merkbarer Wärmeentwicklung eine farblose Lösung, welche am folgenden Tag unverändert war und dann mit 50 ml Wasser ein homogenes Gemisch ergab. Bei der freiwilligen Eindunstung wurden daraus 1,5 g einer schwach teigigen Kristallmasse erhalten, welche bei ca. 190°–195° schmolz und beim Umkristallisieren aus 100 ml gew. Alkohol 0,5 g feine, farblose Nadelchen des obigen Arabino-thiodiazols vom Schmp. 212°–214° und mit 51,00 % C und 5,00 % H lieferte.

C. Persulfatoxydationen

Eine aus 0,5 g *l*-Arabinose in 50 ml Wasser und der gleichen Menge Thiobenzhydrazid in 3,33 ml 2-n. Salzsäure bereitete Lösung wurde nach 24 Stunden mit 1,0 g Kaliumpersulfat in 25 ml Wasser versetzt, wobei Emulgierung eintrat und bis zum folgenden Tag 0,7 g Thiodiazol-Produkt als mikroskopische Kristallbälle vom Schmp. 201°–203° abgeschieden wurden. Beim Umkristallisieren aus 60 ml gew. Alkohol wurden hieraus 0,35 g farblose Nadelchen vom Schmp. 213°–214° und 50,94 % C sowie 4,90 % H enthaltend abgeschieden.

Nach Lösen von 2,0 g *rac*.-Arabinose-thiobenzhydrazid in 20 ml 0,5-n. Natronlauge wurden 200 ml 0,1-n. Salzsäure hinzugesetzt. Dabei trat keine Fällung ein, aber nach Zusatz einer Lösung von 2 g Kaliumpersulfat in 30 ml gelinde erwärmtem Wasser wurden bis zum folgenden Tag 1,15 g eines cremefarbenen Pulvers vom Schmp. ca. 188°–192° abgeschieden. Beim Umkristallisieren aus 60 ml gew. Alkohol ergab das Produkt 0,75 g 5-*d,l*-Arabinotetraoxybutyl-2-phenyl-1,3,4-thiodiazol vom Schmp. 196°–197°,5 und mit 51,09 % C und 4,99 % H.

Als eine fast auf Zimmertemperatur erkaltete Lösung von 2,85 g *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid in 50 ml 50 %-igem Alkohol mit einer Lösung von 2,7 g Kaliumpersulfat in 50 ml Wasser versetzt wurde, entstand ein homogenes Gemisch, welches sich bald emulgierte und bis zum folgenden Tag 2,1 g mikroskopische Bälle aus nadelförmigen Prismen vom Schmp. 208°–210° ausschied. Das Produkt wurde aus 200 ml gew. Alkohol umkristallisiert und lieferte dabei 1,65 g haarfeine Nadelchen vom Schmp. 213°–214°, mit 51,09 % C und 4,97 % H und für 0,4024 g in Pyridin zu 20,04 ml gelöst: $2\alpha_D^{20} = +1^{\circ},06$, $[\alpha]_D^{20} = +26^{\circ},4$ und $[M]_D^{20} = +74^{\circ},5$.

Beim Versetzen einer Lösung von 2,85 g *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid in 20 ml 0,5-n. Natronlauge mit 2,7 g Kaliumpersulfat in 50 ml Wasser trat schnell Emulgierung ein, und bis zum folgenden Tag wurden 1,6 g einer klebrigen Kristallmasse ausgeschieden, welche mit 50 ml gew. Alkohol in der Wärme 0,3 g ungelöstes Pulver und eine Lösung lieferte, welche beim Erkalten 0,7 g haarfeine Nadelchen vom Schmp. ca. 198°–202° ausschied. Beim Umkristallisieren der beiden Produkte aus Alkohol wurden dann Nadelchen wie vorher erhalten, die bei 212°–214° schmolzen. — Als dagegen 2,85 g *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid in 40 ml 0,5-n. Natronlauge in der gleichen Weise mit Persulfat behandelt wurden, schied das Gemisch bis zum folgenden Tag nur 0,25 g Kristallpulver vom Schmp. ca. 205°–208° aus, und das Filtrat davon wurde von 5 ml 2-n. Salzsäure nicht verändert.

D. Oxydationen mit Eisenchlorid

Beim Versetzen einer Lösung von 3,0 g *l*-Arabinose in 85 ml Wasser mit 3,05 g Thiobenzhydrazid in 15 ml 2-n. Salzsäure entstand eine schwach milchige Lösung, welche bis zum folgenden Tag 2,1 g eines Gemisches von *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid mit dem entsprechenden, durch Luftoxydation entstandenen Tetraoxybutylphenyl-thiodiazol abschied. Das Filtrat davon ergab mit 10 ml 1-m. Eisenchlorid-Lösung ein graugrünes, trübes Gemisch, welches allmählich ein weisses oder in gewissen Bereichen graubraunes, aus mikroskopischen Bällen aus nadelförmigen Prismen bestehendes Pulver ausschied. Das am nächsten Tag abgesaugte Pulver wog 1,4 g und schmolz bei ca. 200°–202°; aus dem Filtrat wurden mit weiteren 10 ml der Eisenchlorid-Lösung noch 0,9 g Pulver vom Aussehen und Schmp. wie das vorige erhalten. Beim Umkristallisieren aus 230 ml gew. Alkohol ergaben die beiden zusammengenommenen Produkte 1,65 g Thiodiazol-Produkt als haarfeine Nadelchen, welche bei 211°–212° unter Zersetzung schmolzen,

ber.:	C 51,05,	H 5,00,	N 9,92,	S 11,36 %,
gef.:	C 50,98,	H 4,98,	N 9,95,	S 11,39 %,

enthielten und für 0,4064 g in Pyridin zu 20,04 ml gelöst $2\alpha_D^{20} = +1^{\circ},02$, $[\alpha]_D^{20} = +25^{\circ},1$, zeigten.

Eine Lösung von 5,7 g *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid in 100 ml heissem, 50 %-igem Alkohol verblieb beim Erkalten homogen und ergab dann mit 40 ml 1-m. Eisenchlorid-Lösung ein dunkel braungrünes Gemisch, welches unter schwacher Wärme- und Gasentwicklung in einen Brei aus feinen Nadeln überging. Diese wurden am folgenden Tag abgesaugt, mit 25 ml 50 %-igem Alkohol gewaschen und an der Luft getrocknet, wonach sie 4,0 g wogen und bei 205°–207° schmolzen. Beim Erhitzen mit 400 ml gew. Alkohol wurden 3,4 g davon gelöst; aus der Lösung kristallisierten beim Erkalten 2,5 g haarfeine Nadelchen vom Schmp. 213°–214°, mit 51,16 % C und 4,91 % H und für 0,4336 g in Pyridin zu 20,04 ml gelöst $2\alpha_D^{20} = +1^{\circ},12$, $[\alpha]_D^{20} = +25^{\circ},9$.

Beim Versetzen einer Lösung von 3 g *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid in 11 ml 1-n. Natronlauge und 9 ml Wasser mit 20 ml der obigen Eisenchlorid-Lösung entstand unter schwacher Wärmeentwicklung eine grünschwarze Emulsion, welche bald eine teigige Masse ausschied. Bei mechanischer Bearbeitung ging diese Masse in ein graues, kristallinisches Pulver über, welches am folgenden Tag abgenutscht, mit Wasser gewaschen und an der Luft getrocknet wurde, wonach es 1,9 g wog und bei ca. 200° unter Zersetzung schmolz. Beim Umkristallisieren aus 300 ml gew. Alkohol ergab das Produkt 0,8 g weisse Nadelchen vom Schmp. 208°–210°, und nach nochmaligem Umkristallisieren in der gleichen Weise schmolz es bei 213°–214°, enthielt 51,38 % C, 5,04 % H, 9,84 % N und 11,40 % S, und in Pyridin wie oben zeigte es $[\alpha]_D^{20} = +25^{\circ},0$.

Die beim ersten Umkristallisieren des vorigen Produktes anfallende Mutterlauge ergab bei der freiwilligen Eindunstung zuerst 0,4 g Nadelchen vom Schmp. 208°–210° und dann 0,35 g eines schwach rotvioletten Pulvers vom Schmp. ca 132°–136°. Beim Umkristallisieren aus Benzol lieferte dieses Pulver farblose Schuppen vom Schmp. des 2,5-Diphenyl-1,3,4-thiodiazols, 141°–142°.

Nach Versetzen einer Lösung von 1,5 g *d*-Arabinose-thiobenzhydrazid in 15 ml 0,5-n. Natronlauge mit 15 ml 1-m. Eisenchlorid-Lösung wurden wie bei der *l*-Form 1,0 g eines graugrünen Pulvers erhalten, welches nach dem Umkristallisieren aus Alkohol bei 213°–214° schmolz und in Pyridin $[\alpha]_D^{20} = -24^{\circ},6$ zeigte.

E. Oxydation mit Benzolsulfonchloramidnatrium

Beim Versetzen einer fast auf Zimmertemperatur erkalteten Lösung von 2,85 g *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid in 50 ml 50 %-igem Alkohol mit einer Lösung von 2,7 g Benzolsulfonchloramidnatrium in 25 ml Wasser entstand ein homogenes Gemisch, welches sich schnell emulgierte und bis zum folgenden Tag 1,45 g Kristallwarzen vom Schmp. 206°–208° ausschied. Beim Umkristallisieren aus 150 ml gew. Alkohol ergab das Produkt 1,0 g haarfeine Nadelchen vom Schmp. 213°–214°, mit 51,10 % C und 4,98 % H, ber. 51,05 % C und 5,00 % H, und für ihre Lösung in Pyridin ($c = 2$) $[\alpha]_D^{20} = +26^{\circ},8$. — Das Filtrat des Rohproduktes schied bei der freiwilligen Eindunstung 2 g Prismen vom Schmp. ca. 130°–145° aus, welche beim Umkristallisieren aus wenig Alkohol reines Benzolsulfonamid vom Schmp. 152°–153° und mit 8,86 % N und 20,62 % S, ber. 8,91 % N und 20,40 % S, lieferten. — Das Filtrat des zweiten Rohproduktes ergab bei der fortgesetzten Eindunstung eine klebrige Kristallmasse, welche mit 20 ml gew. Alkohol in der Wärme behandelt wurde, wonach das Filtrat von dabei ungelöstem Salz mit 1,0 g Thiobenzhydrazid versetzt wurde. Die hierbei entstandene Lösung schied dann bis zum folgenden Tag 0,7 g *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid vom Schmp. 166°–167° und mit 9,79 % N und 11,07 % S, ber. 9,85 % N und 11,28 % S, aus.

F. Oxydation mit Pyridiniumtribromid

Eine in der Wärme aus 2,9 g *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid in 100 ml 50 %-igem Alkohol bereitete Lösung verblieb beim Abkühlen auf 28° unverändert und wurde danach mit einer Lösung von 3,3 g Pyridiniumtribromid vom J-Äquiv.-Gew. 165 in 20 ml Alkohol versetzt. Die Temperatur des Gemisches stieg dabei auf 32° und aus der sich schnell trübenden Lösung wurden bis zum folgenden Tag 1,7 g Thiodiazol-Produkt als nadelförmige Prismen ausgeschieden, welche bei 210°–211° schmolzen und bei der Analyse ergaben:

ber.: C 51,05, H 5,00%; gef.: C 51,47, H 5,16 %.

G. Versuche mit dem 5-*l*-Arabinotetraoxybutyl-2-phenyl-1,3,4-thiodiazol

Nach 10-stündigem Erhitzen auf dem Wasserbad von 3 g 5-*l*-Arabino-tetraoxybutyl-2-phenyl-1,3,4-thiodiazol mit 50 ml 2-n. Salzsäure wurden 2,25 g ungelöstes Material vom Schmp. 205°–207° abgesaugt; aus dem Filtrat wurden beim Erkalten 0,6 g haarfeine Nadelchen vom Schmp. 210°–212° ausgeschieden. — Bei 3-stündiger Behandlung von 0,2803 g des Thiodiazols mit 10 ml Alkohol und 11,18 ml 0,1000-n. Natronlauge trat keine merkbare Auflösung der Substanz ein. Das Gemisch verbrauchte dann gegen Phenolphthalein 11,17 ml 0,1000-n. Salzsäure. — Als dagegen 3,9 g derselben Verbindung mit 40 ml 0,5-n. Natronlauge auf dem Wasserbad erhitzt wurden, trat allmählich vollständige Auflösung ein; als dann das Gemisch nach 3 Stunden erkaltete, wurden 2,3 g Nadelchen vom Schmp. 212°–214° ausgeschieden. Das Filtrat davon war gelbbraun und ergab mit 2 g Essigsäure eine Emulsion, welche schnell 0,85 g kleine Nadelchen vom Schmp. 156°–158° ausschied. Das regenerierte Thiodiazol wurde aufs neue 1/2 Stunde mit 50 ml 0,5-n. Natronlauge erhitzt, wobei eine gelbliche Lösung entstand, welche beim Erkalten 1,15 g Nadelchen vom Schmp. 211°–213° ausschied, während das Filtrat davon mit 2 g

Essigsäure 0,7 g haarfeine Nadeln vom Schmp. 160° – 165° ergab. Das hier zurückgewonnene Material wurde mit 25 ml 0,5-n. Natronlauge 1 Stunde erhitzt, wonach die entstandene Lösung beim Erkalten 0,45 g Nadelchen vom Schmp. 211° – 213° und das Filtrat davon mit Essigsäure 0,45 g Haare vom Schmp. 160° – 162° lieferte. Von den Essigsäurefällungen wurden 2,9 g aus 50 ml gew. Alkohol umkristallisiert, wobei 1,9 g flache, fast nadelförmige Prismen erhalten wurden, welche bei 161° – 163° schmolzen und für 0,4091 g in Pyridin zu 20,04 ml gelöst sofort und nach 4 Stunden $2\alpha_D^{20} = -0^{\circ},32$, $[\alpha]_D^{20} = -7^{\circ},8$, zeigten. Bei 1-stündigem Schütteln von 2,1 g derartiger Produkte mit 20 ml 0,5-n. Natronlauge verblieben 0,25 g eines Pulvers vom Schmp. 211° – 213° ungelöst. Aus dem Filtrat davon wurden mit 10 ml 2-n. Essigsäure 1,5 g flache Nadeln oder schmale Prismen vom Schmp. 162° – 164° und in Pyridin wie oben von $[\alpha]_D^{20} = -14^{\circ},5$ erhalten. Beim Umkristallisieren dieses Produktes aus 25 ml gew. Alkohol wurden 0,85 g flache, fast nadelförmige Prismen einer Verbindung erhalten, welche als Antipode des unten (S. 76) aus dem *d*-Ribose-thiobenzhydrazid gewonnenen 5-*d*-Ribo-tetraoxybutyl-2-phenyl-1,3,4-thiodiazols erkannt wurde: Schmp. 166° – 167° , für 0,4028 g in Pyridin zu 10,04 ml gelöst: $\alpha_D^{20} = -0^{\circ},56$, $[\alpha]_D^{20} = -14^{\circ},0$, und Zusammensetzung:

Für $C_{12}H_{14}O_4N_2S$ (282,31):

ber.:	C 51,05,	H 5,00,	N 9,92,	S 11,36 %
gef.:	C 51,00,	H 4,98,	N 9,90,	S 11,31 %

Beim Schütteln von 0,3545 g des analysierten Präparates mit 16,06 ml 0,1000-n. Natronlauge wurde praktisch alles gelöst; das Gemisch wurde danach von Phenolphthalein rot gefärbt und ergab dann mit 16,00 ml 0,1000-n. Salzsäure Entfärbung und Emulgierung und schied danach haarfeine Nadelchen vom Schmp. 165° – 167° aus. — Nach einstündigem Erhitzen einer Lösung von 0,45 g desselben Produktes in 5 ml 0,5-n. Natronlauge auf dem Wasserbad schied sie beim Erkalten 0,2 g schmale Prismen vom Schmp. 212° – 214° aus. Das Filtrat davon ergab mit Essigsäure 0,1 g besenförmig aggregierte, schmale Prismen vom Schmp. 161° – 163° , woraus hervorgeht, dass eine teilweise Umlagerung des Ribose- in das Arabinose-Derivat stattgefunden hatte.

Nach 4-stündigem Schütteln von 2 g des Arabino-phenylthiodiazols mit einer in der Kälte aus 5 g Natriumhydroxyd in 50 ml Wasser und 2,5 ml Brom bereiteten *Bromlauge* wurden 0,9 g mit 30 ml Wasser, 10 ml Alkohol und derselben Menge Äther gewaschenes Ausgangsmaterial vom Schmp. 205° – 207° zurückgewonnen. Das wässrige Filtrat, welches vom Waschwasser getrübt worden war, wurde mit 2 g Natriumbisulfit versetzt und dann im Vakuum über Schwefelsäure bis zu ca. 40 g Gewicht eingedunstet. Hierbei entstand ein Brei aus weissen Haaren, welche nach dem Absaugen, Waschen mit 3 ml Wasser und Abpressen zwischen Filtrierpapier 0,8 g wogen. An der Luft verloren 0,6102 g dieses Salzes langsam 0,1440 g und dann im Vakuum über Phosphorsäureanhydrid weitere 0,0051 g, oder insgesamt 24,43 % an Gewicht, während ein Gehalt von 4 H_2O 24,00 % entspricht. Danach zeigte es die Zusammensetzung des Natriumsalzes einer Phenyl-thiodiazol-carbonsäure:

Für $C_9H_5O_2N_2Na$ (228,20):

ber.:	N 12,28,	S 14,05,	Na 10,08 %
gef.:	N 12,08,	S 13,51,	Na 9,98 %

Als eine Lösung von 1,85 g des Natriumsalzes in 30 ml Wasser mit 1,0 g Chlorcalcium in 10 ml Wasser versetzt wurde, entstand eine Fällung, welche am folgenden

Tag aus 1,7 g mikroskopischen, flachen Prismen bestand. Dieses wie oben getrocknete Salz verlor an der Luft langsam 10,43 und danach im Vakuum über Phosphorsäureanhydrid noch 0,33 oder insgesamt 10,76, für 3 H₂O ber. 10,74, %, an Gewicht und ergab dann:

Für C₁₈H₁₆O₄N₄S₂Ca (450,49):

ber.: C 47,99,	H 2,24,	N 12,44,	S 14,23,	Ca 8,90 %,
gef.: C 47,74,	H 2,28,	N 12,44,	S 14,10,	Ca 8,70 %.

Als eine Lösung von 4 g des Natriumsalzes in 40 ml Wasser mit 10 ml 2-n. Salzsäure versetzt wurde, entstand eine Fällung von äusserst kleinen Nadelchen, welche sogleich abgesaugt, mit 20 ml Wasser gewaschen und auf Tonscherben getrocknet wurden, wonach sie 2,6 g wogen, bei ca. 65°–67° unter heftiger Gasentwicklung schmolzen und gemäss der Analyse aus einem Gemisch der erwarteten 2-Phenyl-1,3,4-thiodiazol-5-carbonsäure mit ihrem Decarboxylierungsprodukt, dem 2-Phenyl-1,3,4-thiodiazol selbst, bestanden:

Für 0,4 C₉H₆O₂N₂S + 0,6 C₉H₆N₂S (179,81):

ber.: C 56,11,	H 3,36,	N 15,58,	S 17,83 %,
gef.: C 56,17,	H 3,47,	N 15,75,	S 17,46 %.

Das genannte 2-Phenyl-1,3,4-thiodiazol wurde rein erhalten, als das beim Absaugen des von der Bromlauge ungelösten Arabino-phenylthiodiazols entstandene und mit Bisulfit versetzte, wässrige Filtrat mit 10 ml 5-n. Salzsäure versetzt wurde. Die dabei entstandene und am folgenden Tag abgesaugte, aus 0,6 g nadelförmigen Prismen bestehende Fällung schmolz bei 39°–40° und ergab bei vorsichtiger Fällung mit Petroläther aus Benzol naphthalinähnliche Schuppen vom Schmp. 40°–41°.

Für C₈H₆N₂S (162,21):

ber.: C 59,23,	H 3,73,	N 17,27,	S 19,77 %,
gef.: C 59,12,	H 3,82,	N 17,21,	S 19,71 %.

Eine Lösung von 0,2033 g des analysierten Präparates in 10 ml Alkohol ergab mit Phenolphthalein und 0,06 ml 0,1000-n. Natronlauge Rotfärbung; nach dem Zusatz von noch 10,40 ml der Lauge wurde sie am folgenden Tag von 10,40 ml 0,1000-n. Salzsäure entfärbt, wonach sie mit 0,16 ml 1/10-n. J-Lösung eine verbleibende Gelbfärbung aufwies.

Versuche, das 5-l-Arabinotetraoxybutyl-2-phenyl-1,3,4-thiodiazol mit *Formalin* oder mit *Thioglykolsäure* umzusetzen, gelangen nicht.

2. Oxydationsprodukte des *d*-Xylose-thiobenzhydrazids

Als Lösungen von je 2,85 g *d*-Xylose-thiobenzhydrazid in 20 ml 50 %-igem Alkohol mit 2 bzw. 4 g *Perhydrol* versetzt wurden, schieden sie bis zum folgenden Tag 0,55 und 0,65 g Kristallschuppen vom Schmp. 135°–138° aus. Bei freiwilligem Eindunsten der Mutterlaugeen wurden noch eine Spur ähnlicher Produkte und im übrigen nur undefinierbare, teigige Massen erhalten. Die Kristallschuppen wurden zuerst aus Alkohol und dann aus Benzol umkristallisiert, wonach sie aus reinem 2,5-Diphenyl-1,3,4-thiodiazol vom Schmp. 142°–143° und mit 11,77 % N und 13,58 % S, ber. 11,76 % N und 13,46 % S, bestanden.

Ein Gemisch aus 3,0 g *d*-Xylose in 185 ml Wasser und 3,05 g Thiobenzhydrazid in 15 ml 2-n. Salzsäure schied im Laufe von 2 Tagen nur 0,05 g kleine Schuppen vom Schmp. ca. 125°–135° aus und bei der freiwilligen Eindunstung der Mutterlauge während einer Woche wurde ca. 1 g einer stark teigigen, gelbbraunen Masse aus zum Schluss 75 ml Lösung ausgeschieden. Die Lösung wurde von 5 g Natriumazetat in etwas Wasser emulgiert, ergab aber nur einen unbedeutenden, klebrigen Bodenbelag; als die davon abdekantierte Lösung weiter an der Luft gelassen wurde, setzte sie im Laufe von 9 Tagen 1,2 g eines grobkristallinen Pulvers vom Schmp. 149°–151° und der Zusammensetzung eines Tetraoxybutyl-phenyl-thiodiazols ab:

Für $C_{12}H_{14}O_4N_2S$ (282,31):

ber.: C 51,05,	H 5,00,	N 9,92,	S 11,36 %,
gef.: C 51,47,	H 5,03,	N 9,92,	S 11,60 %.

Von diesem Produkt zeigten 0,5241 g in Pyridin zu 10,04 ml gelöst 10 Minuten und 3 Stunden nach dem Zusatz des Lösungsmittels $\alpha_D^{20} = +0^\circ,40$, $[\alpha]_D^{20} = +7^\circ,7$ und $[M]_D^{20} = +21^\circ,7$.

Beim Versetzen einer Lösung von 7,6 g *d*-Xylose-thiobenzhydrazid in 60 ml 50 %-igem Alkohol mit 7,6 g Kaliumpersulfat in 130 ml Wasser trat eine schwache Wärmeentwicklung ein. Bis zum folgenden Tag wurden 1,8 g eines kristallinen Pulvers vom Schmp. ca. 120°–140° ausgeschieden, während das Filtrat bei der freiwilligen Eindunstung noch 3,8 g eines ähnlichen Produktes vom Schmp. ca. 130°–140° lieferte. Beim Umkristallisieren der vereinigten Produkte aus 30 ml gew. Alkohol wurden 3,0 g flache Prismen vom Schmp. 149°–151° erhalten; nach nochmaligem Umkristallisieren in derselben Weise schmolz das Produkt bei 150°–151°,5, zeigte für 0,5060 g in Pyridin zu 10,04 ml gelöst $\alpha_D^{20} = +0^\circ,36$, $[\alpha]_D^{20} = +7^\circ,1$ und $[M]_D^{20} = +20^\circ,0$, und enthielt 51,30 % C und 5,00 % H.

Beim Versetzen einer Lösung von 2,85 g *d*-Xylose-thiobenzhydrazid in 30 ml 50 %-igem Alkohol mit 25 ml 1-m. Eisenchlorid-Lösung trat Gasentwicklung ein und eine Spur eines graugrünen Pulvers wurde ausgeschieden. Das grüngelbe Filtrat davon schied dann bei der freiwilligen Eindunstung während 2 Tagen 1,25 g einer teigigen Kristallmasse aus, welche beim Umkristallisieren aus 5 ml gew. Alkohol 0,7 g schmale Schuppen oder dünne Täfelchen vom Schmp. 149°–151° lieferte. Dieses Präparat zeigte in Pyridin wie oben $[\alpha]_D^{20} = +7^\circ,0$ und enthielt 51,12 % C, 4,99 % H, 9,84 % N und 11,33 % S.

Als dagegen eine Lösung von 2,9 g des Xylose-thiobenzhydrazids in 21 ml 0,5-n. Natronlauge mit Eisenchlorid wie oben versetzt wurde, ging eine zuerst abgeschiedene, graugrüne, klebrige Masse bis zum folgenden Tag in 0,9 g eines dunkelgrünen Pulvers über, welches beim Umkristallisieren aus 10 ml Alkohol 0,35 g 2,5-Diphenyl-1,3,4-thiodiazol vom Schmp. 139°–141° lieferte.

Eine in der Wärme aus 2,9 g *d*-Xylose-thiobenzhydrazid, 25 ml Alkohol und 25 ml Wasser bereitete Lösung wurde nach dem Erkalten mit einer Lösung von 3,3 g Pyridiniumtribromid vom J-Äquiv.-Gew. 165 in 20 ml Alkohol versetzt, wobei unter kaum merkbarer Gasentwicklung die Temperatur auf 27° stieg und bis zum nächsten Tag ein unbedeutender Bodenbelag abgesetzt wurde. Das Filtrat davon schied beim freiwilligen Eindunsten 0,7 g farblose Schuppen aus, welche nach Umkristallisieren aus gew. Alkohol bei 148°–149°,5 schmolzen und 51,78 % C und 4,97 % H, ber. 51,05 % C und 5,00 % H, enthielten.

Beim Erhitzen von 4,2 g durch Oxydation des aus *d*-Xylose-thiobenzhydrazid mit Kaliumpersulfat dargestellten 5-*d*-Xylotetraoxybutyl-2-phenyl-1,3,4-thiodia-

zols mit 30 ml 0,5-n. Natronlauge entstand eine Lösung, welche nach 2 Stunden nur eine unbedeutende Menge eines uneinheitlichen Pulvers ausgeschieden hatte. Das Filtrat davon veränderte sich beim Erkalten nicht und ergab dann mit Essigsäure nur etwas rotbraunes Öl. Bei einem neuen Versuch wurden 2,8 g umkristallisiertes Oxydationsprodukt mit 25 ml 0,5-n. Natronlauge geschüttelt, wobei unmittelbar eine klare Lösung entstand, welche nach t Minuten die folgenden Drehungen zeigte:

t :	0	120	680	1 400
$0,5 \alpha_D^{20}$:	$+0^\circ,62$	$+0^\circ,65$	$+0^\circ,68$	$+0^\circ,67$.

Nach 1/2-stündigem Erhitzen auf dem Wasserbad und Erkalten wurde das fortwährend homogene Gemisch durch 10 ml 2-n. Essigsäure nicht verändert, aber bei der freiwilligen Eindunstung schied es dann 2,2 g Kristallbälle vom Schmp. 115° – 120° aus. Beim Umkristallisieren aus 10 ml gew. Alkohol lieferte das Produkt 1,1 g flache Prismen oder schmale Täfelchen vom Schmp. 122° – 126° , welche wie das Ausgangsmaterial zusammengesetzt waren, indem sie 51,13 % C, 5,02 % H, 9,99 % N und 11,32 % S enthielten, und von denen 0,25 g in 10 ml Pyridin kein beobachtbares Drehungsvermögen zeigten. Da ein Gemisch aus 70 % 5-*d*-Xylo- und 30 % 5-*d*-Lyxotetraoxybutyl-2-phenyl-1,3,4-thiodiazol ebenfalls inaktiv sein sollte, wurden 1,7 g jener und 0,7 g dieser Verbindung zusammen mit 2 ml Alkohol erwärmt, wobei eine Lösung erhalten wurde, welche beim Erkalten zu einer kompakten Kristallmasse erstarrte. Nach dem Trocknen auf Tonscherben wog dieses Produkt 2,15 g, schmolz bei 121° – 130° , enthielt 51,16 % C und 5,00 % H und zeigte für 0,35 g in Pyridin wie oben $\alpha_D^{20} = \pm 0^\circ,00$.

3. Oxydationsprodukt des *d*-Lyxose-thiobenzhydrazids

Beim Versetzen einer Lösung von 2,85 g *d*-Lyxose-thiobenzhydrazid in 50 ml warmem, 50 %-igem Alkohol mit 2,7 g *Kaliumpersulfat* in 50 ml Wasser entstand ein Gemisch, welches bald milchig wurde und bis zum folgenden Tag eine Spur einer klebrigen Masse ausschied. Das Filtrat davon lieferte dann bei der freiwilligen Eindunstung im Laufe von 5 Tagen 1,9 g einer teigigen Kristallmasse, welche beim Umkristallisieren aus 10 ml gew. Alkohol 0,9 g einer Kristallkruste vom Schmp. 139° – 141° ergab. Nach erneuerter Umkristallisation in der gleichen Weise bestand das so erhaltene 5-*d*-Lyxotetraoxybutyl-2-phenyl-1,3,4-thiodiazol aus schmalen Prismen vom Schmp. 141° – 143° .

Für $C_{12}H_{14}O_4N_2S$ (282,31):

ber.:	C 51,05,	H 5,00,	N 9,92,	S 11,36 %
gef.:	C 51,05,	H 4,97,	N 9,94,	S 11,31 %

Eine Lösung von 0,2878 g der analysierten Verbindung in Pyridin zu 10,04 ml gelöst zeigte sogleich und nach 20 und 400 Minuten $\alpha_D^{20} = -0^\circ,48$, $[\alpha]_D^{20} = -16^\circ,7$ und $[M]_D^{20} = -47^\circ,1$.

4. Oxydationsprodukt des *d*-Ribose-thiobenzhydrazids

Das Filtrat von den S. 54 erhaltenen, 13 g rohen *d*-Ribose-thiobenzhydrazid wurde mit 20 ml 1-m. *Eisenchlorid*-Lösung versetzt, wobei ein grünbraunes Gemisch

entstand, welches nur eine Spur von graufarbenen Schuppen ausschied. Das Filtrat davon schied beim freiwilligen Eindunsten 0,9 g einer etwas klebrigen Masse von ballenartig aggregierten Nadeln aus, welche beim Umkristallisieren aus 10 ml gew. Alkohol 0,4 g flache Prismen vom Schmp. 165° – 166° lieferte. — Das beim Umkristallisieren des rohen *d*-Ribose-thiobenzhydrazids aus Alkohol anfallende Filtrat wurde seinerseits mit einer Lösung von 1,6 g *Kaliumpersulfat* in 25 ml Wasser versetzt, wobei Salze ausgeschieden wurden, welche bei der freiwilligen Eindunstung des Gemisches gelöst wurden, während statt ihrer 0,9 g einer teigigen Kristallmasse ausgeschieden wurden. Beim Umkristallisieren dieses Produktes aus 10 ml gew. Alkohol wurden 0,3 g flache Prismen vom Schmp. 164° – 165° erhalten; als die beiden einander entsprechenden Präparate zusammen aus 10 ml gew. Alkohol umkristallisiert wurden, ergaben sie 0,4 g Kristalle wie vorher und vom Schmp. 166° – 167° .

Für $C_{12}H_{14}O_4N_2S$ (282,31):

ber.: C 51,05, H 5,00%; gef.: C 51,06, H 4,98 %.

Von dem analysierten Präparat zeigten 0,3982 g in Pyridin zu 10,04 ml gelöst sogleich und nach 80 Minuten $\alpha_D^{20} = +0^{\circ},70$, $[\alpha]_D^{20} = +17^{\circ},6$ und $[M]_D^{20} = +49^{\circ},7$.

Als 0,7 g 5-*d*-Ribotetraoxybutyl-2-phenyl-1,3,4-thiodiazol mit 5 ml 0,5-n. Natronlauge erwärmt wurden, entstand eine Lösung, welche nach einer Stunde auf dem Wasserbad 0,2 g und dann beim Erkalten 0,1 g flache Nadelchen oder schmale Prismen vom Schmp. 211° – 213° ausschied. Das Produkt, welches mit dem 5-*d*-Arabinotetraoxybutyl-2-phenyl-1,3,4-thiodiazol ein Gemisch ergab, das auch bei 211° – 213° schmolz, enthielt 51,14 % C und 4,99 % H, ber. 51,05 % C und 5,00 % H.

5. Oxydationsprodukte des *l*-Rhamnose-thiobenzhydrazids

Beim Versetzen einer Lösung von 3,0 g *l*-Rhamnose-thiobenzhydrazid in 21 ml 0,5-n. Natronlauge mit 20 ml 1-m. *Eisenchlorid*-Lösung schied sie eine schwarzgrüne, halbfeste Masse aus, welche nach ein paar Stunden in 1,8 g eines grauen, feinkristallinischen Pulvers vom Schmp. ca. 180° – 185° übergegangen war. Bei Behandlungen mit 20 + 10 ml heissem Benzol verblieben 1,15 g davon ungelöst; die Lösung ergab nach dem Erkalten und bei freiwilliger Eindunstung 0,65 g eines teigigen Rückstandes, welcher beim Umkristallisieren aus Alkohol Schuppen von 2,5-Diphenyl-1,3,4-thiodiazol vom Schmp. 138° – 140° lieferte. — Das vom Benzol ungelöste Material ergab beim Umkristallisieren aus 20 ml gew. Alkohol 0,6 g farblose Schuppen vom Schmp. 183° – 185° ; als 1,0 g solcher Produkte aus 15 ml desselben Alkohols umkristallisiert wurden, wurden 0,7 g schmale, farblose Schuppen oder dünne Täfelchen vom Schmp. 186° – 187° erhalten.

Für $C_{13}H_{16}O_4N_2S$ (296,33):

ber.: C 52,69, H 5,44, N 9,45, S 10,82 %,
gef.: C 52,67, H 5,33, N 9,48, S 10,70 %.

Von dem so erhaltenen 5-*l*-Rhamnotetraoxyamyl-2-phenyl-1,3,4-thiodiazol zeigten 0,4308 g in Pyridin zu 10,04 ml gelöst $\alpha_D^{20} = +1^{\circ},14$, $[\alpha]_D^{20} = +26^{\circ},6$ und $[M]_D^{20} = +78^{\circ},8$.

6. Oxydationsprodukte des *d*-Glucose-thiobenzhydrazids

Aus einer Lösung von 3,6 g *d*-Glucose in 285 ml Wasser und 3,05 g Thiobenzhydrazid in 15 ml 2-n. Salzsäure wurden bis zum folgenden Tag 3,5 g *d*-Glucose-thiobenzhydrazid vom Schmp. 182°–183° und $[\alpha]_D^{20} = -42,8$ (in Pyridin) ausgeschieden. Die Mutterlauge ergab dann bei der *freiwilligen Eindunstung* während 12 Tage 1,2 g des unten beschriebenen 5-*d*-Glucopentaoxyamyl-2-phenyl-1,3,4-thiodiazols als kristallinisches Pulver vom Schmp. 189°–191° und $[\alpha]_D^{20} = -3,5$ (in Pyridin).

Beim Versetzen einer Lösung von 3,2 g *d*-Glucose-thiobenzhydrazid in 21 ml 0,5-n. Natronlauge mit 3 g *Kaliumpersulfat* in 50 ml Wasser trübte sich das Gemisch allmählich, und bis zum folgenden Tag schied es 1,35 g rotgelbes, undeutlich kristallinisches Pulver aus. Beim Umkristallisieren aus 50 ml gew. Alkohol ergab das Produkt 0,7 g haarfeine Nadelchen vom Schmp. ca. 185°–190° und bestand nach neuem Umkristallisieren aus 20 ml desselben Alkohols aus 0,4 g reinem Thiodiazol-Produkt vom Schmp. 196°–198°.

Für $C_{13}H_{16}O_5N_2S$ (312,33):

ber.: C 49,99,	H 5,16,	N 8,97,	S 10,27 %,
gef.: C 50,10,	H 5,26,	N 9,08,	S 10,17 %.

Das Filtrat des rohen Oxydationsproduktes ergab bei der freiwilligen Eindunstung noch 0,2 g eines rötlichen Pulvers; das neue Filtrat lieferte mit 1,5 g Thiobenzhydrazid in 6 ml 2-n. Salzsäure 1,5 g einer etwas klebrigen Kristallmasse, welche beim Umkristallisieren aus 100 ml gew. Alkohol 1,05 g *d*-Glucose-thiobenzhydrazid als flache Nadelchen vom Schmp. 182°–183°, mit 49,85 % C und 5,74 % H, ber. 49,67 % C und 5,77 % H, und in Pyridin von $[\alpha]_D^{20} = -39,7$ ergab.

Nach Erkalten bis zur beginnenden Kristallisation einer Lösung von 3,15 g *d*-Glucose-thiobenzhydrazid in 50 ml heissem, 50 %-igem Alkohol wurden 2,7 g *Kaliumpersulfat* in 50 ml Wasser zugesetzt. Dabei trat schnell Trübung ein und bis zum folgenden Tag wurden 1,6 g nadelförmige Prismen vom Schmp. ca. 180°–195° ausgeschieden. Beim Umkristallisieren aus 100 ml gew. Alkohol ergab dieses Produkt 1,1 g farblose, haarfeine Nadelchen vom Schmp. 196°–198°, 50,08 % C und 5,24 % H enthaltend und von $[\alpha]_D^{20} = -4,5$ (in Pyridin). — Das Filtrat des Rohproduktes ergab bei der freiwilligen Eindunstung noch 0,85 g einer teigigen Kristallmasse, welche beim Umkristallisieren aus 50 ml gew. Alkohol 0,25 g Nadelchen vom Schmp. 196°–198° lieferte; aus dem Filtrat jener Masse konnte auch mittels Thiobenzhydrazid etwas *d*-Glucose-thiobenzhydrazid gewonnen werden.

Beim Versetzen einer Lösung von 3,2 g *d*-Glucose-thiobenzhydrazid in 21 ml 0,5-n. Natronlauge mit 20 ml 1-m. *Eisenchlorid*-Lösung entstand ein dunkel braun-grünes Gemisch, welches sich unter schwacher Gasentwicklung allmählich zu trüben begann und bis zum folgenden Tag 1,3 g eines graugrünen, kristallinischen Pulvers ausschied. Die Mutterlauge ergab mit noch 5 ml der Chloridlösung 0,2 g Pulver wie vorher und, als die vereinigten Produkte in der Hitze mit 20 + 10 ml Benzol behandelt wurden, verblieben 0,8 g davon ungelöst. Das Filtrat davon ergab beim Erkalten und freiwilligen Eindunsten 0,7 g einer teigigen Kristallmasse, welche beim Umkristallisieren aus gew. Alkohol 0,35 g 2,5-Diphenyl-1,3,4-thiodiazol vom Schmp. 140°–142° lieferte. — Das von dem Benzol ungelöste Produkt ergab beim Kristallisieren aus 40 ml gew. Alkohol 0,5 g haarfeine, farblose Nadelchen vom Schmp. 194°–196° und, als 1,1 g derartige Produkte aus 70 ml desselben Alkohols

umkristallisiert wurden, ergaben sie 0,9 g haarfeine Nadeln vom Schmp. 196° – 198° , mit 50,38 % C und 5,07 % H und für 0,4069 g in Pyridin zu 10,04 ml gelöst $\alpha_D^{20} = -0^{\circ}20$, $[\alpha]_D^{20} = -4^{\circ}9$ und $[m]_D^{20} = -15^{\circ}3$.

Eine Lösung von 3,2 g *d*-Glucose-thiobenzhydrazid in 100 ml warmem, 50 %-igem Alkohol fing beim Abkühlen auf 35° an, Kristalle abzuscheiden und wurde dann mit einer Lösung von 3,3 g *Pyridiniumtribromid* vom J-Äquiv.-Gew. 165 in 20 ml Alkohol versetzt, wobei unter sehr schwacher Gasentwicklung die Temperatur auf 40° stieg und dann beim Erkalten 0,9 g Thiodiazolprodukt als schmale und flache Prismen abgeschieden wurden. Diese schmolzen bei 195° – 196° und enthielten:

ber.: C 49,99, H 5,16%; gef.: C 50,00, H 5,13 %.

Beim Erhitzen von 3,1 g des oben erhaltenen 5-*d*-Glucopentaoxyamyl-2-phenyl-1,3,4-thiodiazols mit 20 ml 0,5-n. Natronlauge entstand eine Lösung, welche nach 2 Stunden gelbrot geworden war und dann beim Erkalten 1,0 g Kristallpulver vom Schmp. 185° – 188° ausschied. Beim Umkristallisieren aus 100 ml gew. Alkohol wurden hieraus 0,6 g Ausgangsmaterial als haarfeine Nadelchen vom Schmp. 196° – 198° und $[\alpha]_D^{20} = -4^{\circ}2$ (in Pyridin) zurückgewonnen. — Die Mutterlauge des Rohproduktes ergab mit 10 ml 2-n. Essigsäure 1,7 g nadelförmige Prismen vom Schmp. ca. 185° – 195° , nach Umkristallisieren aus 100 ml gew. Alkohol 1,2 g Nadeln vom Schmp. 190° – 198° und (in Pyridin) von $[\alpha]_D^{20} = -10^{\circ}0$. Nach noch drei Umkristallisationen in derselben Weise schmolz die Verbindung sowohl für sich wie im Gemisch mit dem in dem folgenden Paragraphen beschriebenen 5-*d*-Mannopentaoxyamyl-2-phenyl-1,3,4-thiodiazol bei 205° – 207° , enthielt 50,00 % C und 5,15 % H, ber. 49,99 % C und 5,16 % H, und 0,4107 g davon zeigten in Pyridin zu 10,04 ml gelöst $\alpha_D^{20} = -0^{\circ}52$, $[\alpha]_D^{20} = -12^{\circ}7$.

7. Oxydationsprodukte des *d*-Mannose-thiobenzhydrazids

Aus 3,6 g *d*-Mannose in 285 ml Wasser und 3,05 g Thiobenzhydrazid in 15 ml 2-n. Salzsäure wurden bis zum folgenden Tag 5,6 g *d*-Mannose-thiobenzhydrazid vom Schmp. 191° – 192° und $[\alpha]_D^{20} = +17^{\circ}0$ (in Pyridin, $c = 2$) erhalten. Die Mutterlauge von zwei solchen Versuchen lieferten bei der Eindunstung an der Luft auf 25 ml Volumen 0,7 g prismatische Kriställchen vom Schmp. ca. 190° – 200° (unter Braunfärbung und Aufschäumen) und beim Umkristallisieren aus 50 ml gew. Alkohol wurden hieraus 0,45 g 5-*d*-Mannopentaoxyamyl-2-phenyl-1,3,4-thiodiazol als nadelförmige Prismen vom Schmp. 206° – 207° à 208° erhalten.

Für $C_{13}H_{16}O_5N_2S$ (312,33):

ber.: C 49,99, H 5,16, N 8,97, S 10,27 %,
gef.: C 50,21, H 5,14, N 9,05, S 10,19 %.

Von dem analysierten Präparat wurden 0,3988 g in gelinder Wärme in Pyridin gelöst; nach dem Erkalten und Auffüllen auf 10,04 ml zeigte die Lösung $\alpha_D^{20} = -0^{\circ}52$, $[\alpha]_D^{20} = -13^{\circ}1$.

Beim Versetzen einer Lösung von 3,15 g *d*-Mannose-thiobenzhydrazid in 21 ml 0,5-n. Natronlauge mit 25 ml 1-m. *Eisenchlorid*-Lösung trat eine schwache Gasentwicklung ein und entstand ein gelatinöser Brei, welcher bis zum folgenden Tag 1,5 g eines grauen, kristallinischen Pulvers ausschied. Bei der Behandlung von 3 g solchen Pulvers mit 50 ml heissem Benzol verblieben 1,7 g davon ungelöst und bei

der freiwilligen Eindunstung des Filtrates wurden 1,3 g einer etwas teigigen Kristallmasse erhalten, welche beim Umkristallisieren aus 40 ml gew. Alkohol 0,5 g 2,5-Diphenyl-1,3,4-thiodiazol vom Schmp. 140° – 142° lieferte. — Das vom Benzol ungelöste Pulver wurde zweimal aus Alkohol umkristallisiert, wobei es zum Schluss als farblose, nadelförmige Prismen vom Schmp. 205° – 207° erhalten wurde. Dieses Präparat von 5-*d*-Mannopentaoxyamyl-2-phenyl-1,3,4-thiodiazol enthielt 50,13 % C, 5,27 % H, 8,98 % N und 10,32 % S; 0,4025 g davon in Pyridin wie oben zeigten $\alpha_D^{20} = -0^{\circ},53$, $[\alpha]_D^{20} = -13^{\circ},2$ und $[M]_D^{20} = -41^{\circ},2$.

8. Oxydationsprodukte des *d*-Galaktose-thiobenzhydrazids

Beim Versetzen einer Lösung von 3,6 g *d*-Galaktose in 285 ml Wasser mit 3,05 g Thiobenzhydrazid in 15 ml 2-n. Salzsäure entstand ein opaleszierendes Gemisch, welches bis zum folgenden Tag 3,8 g *d*-Galaktose-thiobenzhydrazid als kleine Warzen vom Schmp. 175° – 176° und (in Pyridin) von $[\alpha]_D^{20} = -37^{\circ},3$ ausschied. Die Mutterlauge ergab bei der *freiwilligen Eindunstung* zuerst während 2 Tage 0,85 g ähnlicher Körnchen vom Schmp. 177° – 179° und $[\alpha]_D^{20} = -34^{\circ},3$ und dann während 4 Tage 0,3 g von unscharfem Schmp. und $[\alpha]_D^{20} = -27^{\circ},4$, wonach bei der fortgesetzten Eindunstung kleine Sternchen von nadelförmigen Prismen abgeschieden wurden. Diese schmolzen bei ca. 190° – 205° und zeigten in Pyridin kein Drehungsvermögen, weshalb sie anscheinend hauptsächlich aus dem unten beschriebenen 5-*d*-Galaktopentaoxyamyl-2-phenyl-1,3,4-thiodiazol bestanden.

Aus 3,15 g *d*-Galaktose-thiobenzhydrazid in 21 ml 0,5-n. Natronlauge und 20 ml 1-m. *Eisenchlorid*-Lösung wurden bis zum folgenden Tag 1,7 g eines grauen, feinkörnigen Pulvers erhalten, welches beim Erhitzen mit 30 ml Benzol 1,0 g ungelöstes Material lieferte, während aus der Lösung wie üblich ein wenig 2,5-Diphenyl-1,3,4-thiodiazol isoliert werden konnte. — Das ungelöste Pulver wurde aus viel Alkohol umkristallisiert und dabei als schmale Schuppen vom Schmp. 209° – 211° erhalten. Beim Erwärmen von 1,85 g derartiger Produkte mit 300 ml gew. Alkohol lösten sich 1,15 g davon; aus der Lösung kristallisierten beim Erkalten 0,8 g besenförmige Aggregate von haarfeinen Nadeln, welche unter Gasentwicklung nach Braunfärbung bei 222° – 224° schmolzen. Der ungelöste Teil wurde in der erwärmten Mutterlauge gelöst und ergab dann beim Erkalten der Lösung noch 0,7 g Kristalle wie vorher.

Für $C_{13}H_{16}O_5N_2S$ (312,33):

ber.:	C 49,99,	H 5,16,	N 8,97,	S 10,27 %.
gef.:	C 50,05,	H 5,11,	N 9,06,	S 10,22 %.

Eine in gelinder Wärme dargestellte Lösung von 0,1994 g der analysierten Substanz in Pyridin zu 20,04 ml zeigte $\alpha_D^{20} = +0^{\circ},30$, $[\alpha]_D^{20} = +15^{\circ},1$ und $[M]_D^{20} = +47^{\circ},2$.

Beim Versetzen einer in der Wärme bereiteten und bis zu 25° erkalteten Lösung von 3,2 g *d*-Galaktose-thiobenzhydrazid in 100 ml 50 %-igem Alkohol mit einer Lösung von 3,4 g *Pyridiniumtribromid* vom J-Äquiv.-Gew. 168 in 20 ml Alkohol trat eine schwache Wärmeentwicklung ein und das Gemisch entfärbte sich schnell unter beginnender Kristallisation. Das am folgenden Tag abgesaugte Reaktionsprodukt von farblosen Nadelchen wog 2,2 g und schmolz bei ca. 200° – 215° ; beim Umkristallisieren von 2 g davon aus 100 ml 50 %-igem Alkohol wurden 1,6 g reines 5-*d*-Galaktopentaoxyamyl-2-phenyl-1,3,4-thiodiazol vom Schmp. 222° – 224° und mit 50,03 % C und 5,26 % H, ber. 49,99 % C und 5,16 % H, erhalten.

Beim Erhitzen auf dem Wasserbad von 4,3 g 5-*d*-Galaktopentaoxyamyl-2-phenyl-1,3,4-thiodiazol (Rohprodukt) mit 14 ml 1-n. Natronlauge und 30 ml Alkohol entstand in 15 Minuten eine braune Lösung, welche nach 2-stündigem Erhitzen beim Erkalten und bis zum folgenden Tag 1,3 g unverändertes Ausgangsmaterial vom Schmp. ca. 210°–212° ausschied, während das Filtrat davon mit 10 ml 2-n. Essigsäure noch 0,4 g eines Kristallpulvers vom Schmp. ca. 211°–214° ergab. Das Filtrat davon lieferte dann bei der freiwilligen Eindunstung 1,7 g Nadelchen vom Schmp. ca. 175°–178°; als das regenerierte Galaktose-Derivat aufs neue eine Stunde mit 4,5 ml 1-n. Natronlauge und 10 ml Alkohol erwärmt worden war, schied die entstandene Lösung beim Erkalten 0,5 g Ausgangsmaterial vom Schmp. 215°–217° aus, während das Filtrat davon mit Essigsäure 0,6 g Nadelchen vom Schmp. ca. 175°–188° ausschied. Die erhaltenen Produkte vom Schmp. ca. 175°–178° und ca. 175°–188° wurden zusammen aus 20 ml gew. Alkohol umkristallisiert, wobei sie 1,1 g 5-*d*-Talopentaoxyamyl-2-phenyl-1,3,4-thiodiazol vom Schmp. 175°–178° lieferten. Von derartigen Produkten wurden 1,9 g eine Stunde mit 20 ml 0,5-n. Natronlauge geschüttelt, wonach das gelbbraune Filtrat einer Spur eines schlammartigen Pulvers beim Ansäuern mit 10 ml 2-n. Essigsäure in einen fast gelatinösen Brei überging. Beim Erwärmen ging dieses Gemisch in eine braungelbe Lösung über, welche nach Entfärbung mit etwas Tierkohle beim Erkalten 1,4 g farblose Nadelchen vom Schmp. 177°–179° ausschied.

Für $C_{13}H_{16}O_5N_2S$ (312,33):

ber.:	C 49,99,	H 5,16,	N 8,97,	S 10,27 %,
gef.:	C 50,00,	H 5,18,	N 9,00,	S 10,29 %.

Eine Lösung von 0,5066 g des analysierten Präparates in Pyridin zu 10,00 ml gelöst zeigte sogleich und nach 3 Stunden $\alpha_D^{20} = -0^\circ,70$, $[\alpha]_D^{20} = -13^\circ,8$ und $[M]_D^{20} = -43^\circ,1$.

Als dann in umgekehrter Weise 0,7 g des erhaltenen Talo-thiodiazols mit 6 ml 0,5-n. Natronlauge erhitzt wurden, entstand sogleich eine klare Lösung, welche nach einer Stunde unverändert war, aber dann beim Erkalten 0,3 g flache Nadeln oder dünne Prismen von 5-*d*-Galaktopentaoxyamyl-2-phenyl-1,3,4-thiodiazol, Schmp. 221°–223°, ausschied, während die Mutterlauge mit Essigsäure ein homogenes Gemisch ergab, aus welchem bis zum folgenden Tag 0,2 g unreines Ausgangsmaterial vom Schmp. ca. 170°–174° ausgeschieden wurden.

9. Oxydationsprodukte des *d*-Fructose-thiobenzhydrazids

Aus einer Lösung von 3,6 g *d*-Fructose in 185 ml Wasser und 3,05 g Thiobenzhydrazid in 15 ml 2-n. Salzsäure wurden bis zum folgenden Tag 1,8 g *d*-Fructose-thiobenzhydrazid vom Schmp. 173°–175° und $[\alpha]_D^{20} = +23^\circ,4$ (in Pyridin) ausgeschieden. Die Mutterlauge ergab dann bei der freiwilligen Eindunstung im Laufe von 8 Tagen noch 3,0 g kleine, flache Prismen von demselben Schmp. und $[\alpha]_D^{20} = +24^\circ,1$; eine Oxydation durch den *Luftsauerstoff* war somit nicht eingetreten.

Eine Lösung von 3,15 g *d*-Fructose-thiobenzhydrazid in 50 ml warmem, 50 %igem Alkohol, welche beim Erkalten sich zu trüben begann, wurde dann mit einer Lösung von 2,7 g *Kaliumpersulfat* in 50 ml Wasser versetzt. Dabei trat bald Emulgierung ein, und bis zum folgenden Tag wurden 0,7 g weisse Bälle aus nadelförmigen Prismen und vom Schmp. ca. 195°–198° ausgeschieden. Beim Umkristallisieren aus

50 ml gew. Alkohol wurden hieraus 0,35 g Nadelchen erhalten, welche für sich und im Gemisch mit dem 5-*d*-Arabinotetraoxybutyl-2-phenyl-1,3,4-thiodiazol von S. 68 bei 213°–214° schmolzen und für 0,3379 g in Pyridin zu 10,04 ml gelöst $[\alpha]_D^{20} = -0^{\circ},84$, $[\alpha]_D^{20} = -25^{\circ},0$, zeigten.

Beim Versetzen einer Lösung von 3,15 g *d*-Fructose-thiobenzhydrazid in 21 ml 0,5-n. Natronlauge mit 20 ml 1-m. *Eisenchlorid*-Lösung schied das Gemisch bis zum folgenden Tag 1,45 g eines gelbbraunen Pulvers ab. Bei der Behandlung dieses Pulvers mit 20 + 10 ml heissem Benzol verblieben 0,6 g davon ungelöst; aus der Lösung wurde wie üblich 2,5-Diphenyl-1,3,4-thiodiazol isoliert. Der vom Benzol ungelöste Anteil des Reaktionsproduktes ergab beim Umkristallisieren aus 50 ml gew. Alkohol 0,35 g 5-*d*-Arabinotetraoxybutyl-2-phenyl-1,3,4-thiodiazol vom Schmp. 212°–214° und (in Pyridin, $c = 4$) $[\alpha]_D^{20} = -25^{\circ},9$.

Für $C_{12}H_{14}O_4N_2S$ (282,31):

ber.:	C 51,05,	H 5,00,	N 9,92,	S 11,36 %,
gef.:	C 51,07,	H 4,92,	N 9,99,	S 11,37 %.

Eine warm bereitete Lösung von 5,7 g *d*-Fructose-thiobenzhydrazid in 125 ml 50 %-igem Alkohol wurde nach dem Erkalten auf 40° mit 20 ml 2-m. *Eisenchlorid*-Lösung versetzt, wobei unter schwacher Gasentwicklung und kaum merkbarer Temperatursteigerung Trübung eintrat und bis zum folgenden Tag 1,6 g graugrüne, haarfeine Nadelchen vom Schmp. ca. 185°–200° ausgeschieden wurden. Beim Umkristallisieren aus 150 ml gew. Alkohol wurden hieraus 0,9 g feine Nadelchen erhalten, welche bei 213°–214° schmolzen, in Pyridin $[\alpha]_D^{20} = -23^{\circ},3$ zeigten und sich auch bei der Analyse als aus dem obigen Arabinotetraoxybutyl-thiodiazol-Derivat bestehend erwiesen:

ber.:	C 51,05,	H 5,00 %;	gef.:	C 50,97, —	H 5,01 %.
-------	----------	-----------	-------	------------	-----------

Das Filtrat dieses Derivates lieferte bei der freiwilligen Eindunstung 1,1 g einer teigigen Kristallmasse, welche beim Umkristallisieren aus 10 ml Benzol 0,3 g farblose Schuppen oder dünne Täfelchen vom Schmp. 99°–102° und der Zusammensetzung des 5-Oxymethyl-2-phenyl-1,3,4-thiodiazols (Formel VI, $n = 1$, S. 35) ergab:

Für $C_9H_8ON_2S$ (192,23):

ber.:	C 56,23,	H 4,20,	N 14,58,	S 16,68 %,
gef.:	C 56,22,	H 4,13,	N 14,55,	S 16,45 %.

Um die Konstitution des zuletzt erhaltenen Thiodiazolproduktes zu bestätigen wurden 1,2 g Glykolaldehyd¹ in 10 ml Wasser gelöst und mit 3,1 g Thiobenzhydrazid in 10 ml Alkohol versetzt; als dann nach 2 Stunden die Lösung mit einer bei der freiwilligen Eindunstung kristallisierten Probe davon versetzt wurde, schied sie im Eisschrank 1,5 g Glykolaldehyd-thiobenzhydrazon als mikroskopische, nadelförmige Prismen vom Schmp. 92°–93° aus.

Für $C_9H_{10}ON_2S$ (194,25):

ber.:	C 55,65,	H 5,19,	N 14,43,	S 16,50 %,
gef.:	C 55,67,	H 5,16,	N 14,44,	S 16,43 %.

Eine Lösung von 1,0 g des Glykolaldehyd-thiobenzhydrazons in 10 ml warmem, gew. Alkohol verblieb beim Erkalten unverändert und wurde dann mit 10 ml 2-m. *Eisenchlorid*-Lösung versetzt, wobei ein braunvioletttes Gemisch entstand und etwas

¹ Das Präparat verdankt der Verf. Hrn. Professor Dr. H. ERDTMAN.

Gas entwickelt wurde. Am folgenden Tag wurden etwas schmierige Absetzungen abfiltriert und das Filtrat freiwillig eingedunstet, wobei 0,65 g auf Tonscherben getrocknete Kristallmassen gewonnen wurden. Beim Umkristallisieren aus 5 ml Benzol ergaben diese 0,4 g cremefarbene Schuppen vom Schmp. 99°–101°, auch im Gemisch mit dem Oxymethyl-phenyl-thiodiazol oben, und von der erwarteten Zusammensetzung:

Für $C_9H_8ON_2S$ (192,23):

ber.:	C 56,23,	H 4,19,	N 14,58,	S 16,68 %,
gef.:	C 56,29,	H 4,15,	N 14,59,	S 16,62 %.

10. Oxydationsprodukt des *l*-Sorbose-thiobenzhydrazids

Beim Erwärmen von 3,6 g aus abs. Alkohol umkristallisierten *l*-Sorbose-thiobenzhydrazids mit 50 ml Wasser entstand eine Lösung, welche beim Erkalten homogen verblieb und dann mit 2,7 g *Kaliumpersulfat* in 50 ml Wasser versetzt wurde. Aus dem Gemisch, welches bald milchig wurde, wurden direkt und bei der freiwilligen Eindunstung teigige Kristallmassen erhalten, welche beim Umkristallisieren aus Benzol 0,4 g flache Prismen vom Schmp. 92°–100° lieferten. — Bei einem gleichen Versuch, aber mit 25 ml 1-m. *Eisenchlorid*-Lösung als Oxydationsmittel, entstand ein violettbraun gefärbtes Gemisch, welches ein dunkelbraunes, viskoses Öl ausschied. Dieses erstarrte bis zum folgenden Tag zu 0,7 g Kristallschuppen vom Schmp. 85°–90°. Aus dem Filtrat wurden bei der freiwilligen Eindunstung noch 0,2 g ähnliche Kristalle vom Schmp. 95°–102° erhalten. — Bei einem neuen Versuch mit dem *l*-Sorbose-thiobenzhydrazid in 30 ml 50 %-igem Alkohol ergab das Eisenchlorid zuerst 0,05 g eines feinkristallinischen Pulvers vom Schmp. ca. 60°–110° und bei der freiwilligen Eindunstung des Filtrates wurden 0,5 g farblose Schuppen vom Schmp. 94°–98° erhalten. — Beim Umkristallisieren von 1,1 g der erhaltenen Produkte aus 10 ml Benzol wurden 0,75 g dünne Täfelchen erhalten, welche bei 98°–101° schmolzen, in Pyridin kein Drehungsvermögen zeigten und sich der Zusammensetzung des 5-Oxymethyl-2-phenyl-1,3,4-thiodiazols erwiesen:

Für $C_9H_8ON_2S$ (192,23):

ber.:	C 56,23,	H 4,19,	N 14,58,	S 16,68 %,
gef.:	C 56,25,	H 4,23,	N 14,42,	S 16,44 %.

11. Oxydationsprodukt des *d*-Sedoheptose-thiobenzhydrazids

Beim Versetzen einer Lösung von 5 g *d*-Sedoheptose-thiobenzhydrazid in 15 ml Wasser mit 13 ml 1-n. Natronlauge und 25 ml 1-m. *Eisenchlorid*-Lösung entstand unter schwacher Gasentwicklung ein grünschwarzes Gemisch, welches bis zum folgenden Tag 1,5 g dunkelgraugrünes Pulver ausschied. Beim Umkristallisieren aus 50 ml gew. Alkohol wurden hieraus 0,4 g verfärbte Nadeln vom Schmp. 208°–210° erhalten. — In derselben Weise und mit derselben Ausbeute verlief die Reaktion, wenn nur Wasser als Lösungsmittel verwendet wurde; beim Umkristallisieren von 0,9 g der vereinigten Reaktionsprodukte unter Zusatz von etwas Tierkohle aus 100 ml gew. Alkohol ergaben sie 0,4 g farblose Nadeln, welche unter schwacher Gasentwicklung bei 212°–213° zu einer gelbbraunen Flüssigkeit schmolzen und gemäss der Analyse und der Konfiguration der *d*-Sedoheptose als 5-Altropentaoxyamyl-2-phenyl-1,3,4-thiodiazol aufzufassen sind.

Für $C_{13}H_{16}O_5N_2S$ (312,33):

ber.: C 49,99,	H 5,16,	N 8,97,	S 10,27 %,
gef.: C 50,01,	H 5,20,	N 9,22,	S 10,01 %.

Eine Lösung von 0,2403 g der analysierten Substanz in Pyridin zu 10,04 ml Volumen gelöst zeigte $\alpha_D^{20} = 0^\circ,27$, $[\alpha]_D^{20} = -11^\circ,3$ und $[M]_D^{20} = -35^\circ,3$.

IV. Umsetzungen von Zucker-thiobenzhydraziden mit Haloidestern

1. Umsetzungen der Arabinose-thiobenzhydrazide mit Haloidestern

A. *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid und Äthylbromid

Eine Lösung von 2,85 g *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid in 10 ml 1-n. Natronlauge lieferte mit 1,5 g Äthylbromid in 10 ml Alkohol ein homogenes Gemisch, welches sich bis zum folgenden Tag nicht veränderte und dann bei der freiwilligen Eindunstung ein viskoses Öl ausschied. Jedoch konnte weder aus dem Öl noch aus der davon abdekantierten Lösung etwas Einheitliches isoliert werden.

B. *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid und Monobromessigsäure

Nach dem Versetzen von 2,9 g pulverisierten *l*-Arabinose-thiobenzhydrazids mit einer Lösung von 1,5 g Monobromessigsäure in 20 ml Essigester trat keine Reaktion ein; nach dem Verwahren 10 Tage lang bei gewöhnlicher Temperatur, gelegentlich umgeschüttelt, enthielt das Gemisch 2,8 g ungelöstes Thiohydrazid vom Schmp. 165° – 166° .

Ein Gemisch aus 2,9 g *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid in 11 ml 1-n. Natronlauge und 1,8 g Monobromessigsäure in 13 ml derselben Lauge wurde nach 15 Minuten mit 3,5 ml 5-n. Salzsäure versetzt. Dabei wurde ein homogenes Gemisch erhalten, welches sich bald emulgierte und 1,3 g feder- oder farnartig aggregierte, kleine Prismen vom Schmp. ca. 125° – 135° ausschied. Beim Umkristallisieren aus 5 ml gew. Alkohol wurden hieraus 0,9 g des vom Verf. früher (2) direkt aus dem Thiobenzhydrazid in analoger Weise dargestellten Anhydrids der Hydrazonobenzoylthioglykolsäure (Formel X, S. 37, $R = R' = H$) vom Schmp. 139° – 140° erhalten.

Für $C_9H_8ON_2S$ (192,23):

ber.: C 56,23,	H 4,20,	N 14,57,	S 16,68 %,
gef.: C 56,24,	H 4,16,	N 14,66,	S 16,88 %.

Die wässrige Mutterlauge der Salzsäurefällung wurde mit 2×50 ml Äther ausgeschüttelt, wonach dieser $2,5 + 0,5$ ml 1-n. Lauge verbrauchte und dann nur 0,05 g Eindunstungsrückstand lieferte. Die extrahierte Lösung wurde mit 5 ml 1-n. Lauge neutralisiert, auf dem Wasserbad auf 10 ml Volumen eingedunstet und dann nach dem Erkalten und Abfiltrieren einer Spur eines dabei ausgeschiedenen, klebrigen Pulvers mit 1,5 g Thiobenzhydrazid in 5 ml Alkohol versetzt, wonach sie 1,0 g *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid vom Schmp. 166° – 167° und $[\alpha]_D^{20} = -37^\circ$ (Pyridin) zurücklieferte.

Bei einem neuen Versuch mit Natriumbromazetat wie oben wurde das am nächsten Tag immer noch homogene Reaktionsgemisch dann mit 1,6 g Thiobenzhydrazid in 20 ml Alkohol versetzt, wonach es 1,1 g *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid vom Schmp. 164°–166° und $[\alpha]_D^{20} = -36^\circ$ (Pyridin) ausschied. Die Analyse des Produktes ergab:

Für $C_{12}H_{16}O_4N_2S$ (284,33):

ber.: C 50,69,	H 5,67,	N 9,85,	S 11,28 %,
gef.: C 50,92,	H 5,65,	N 9,89,	S 11,30 %.

Die Mutterlauge ergab bei der freiwilligen Eindunstung 1,5 g einer heterogenen Kristallmasse, welche beim Schütteln mit 20 ml 0,5-n. Natronlauge 0,5 g eines unlöslichen, violettroten, vermutlich aus Oxydationsprodukten des *l*-Arabinose-thiobenzhydrazids bestehenden Pulvers lieferte, während aus dem Filtrat davon mit Salzsäure 0,8 g Bälle aus farblosen Nadeln ausgefällt wurden. Diese schmolzen bei ca. 150°–155° und ergaben beim Umkristallisieren aus 15 ml gew. Alkohol 0,4 g *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid als Nadeln vom Schmp. 167°–168° und $[\alpha]_D^{20} = -35^\circ,2$ (Pyridin). — Die Mutterlauge der heterogenen Kristallmasse oben wurde mit 5 ml 5-n. Salzsäure versetzt, wobei Emulgierung eintrat und dann 1,2 g kleine Prismen vom Schmp. 138°–139° ausgeschieden wurden. Das Produkt enthielt 14,50 % N und 16,83 % S; es bestand also aus dem Anhydrid der Hydrazonobenzoyl-thioglykolsäure mit ber. 14,57 % N und 16,68 % S.

C. Arabinose-thiobenzhydrazide und *d,l*- α -Brompropionsäure

Nach dem Versetzen einer Lösung von 5,7 g *d*-Arabinose-thiobenzhydrazid in 40 ml 0,5-n. Natronlauge mit 3 g *d,l*- α -Brompropionsäure in derselben Menge der Lauge wurde am folgenden Tag das Filtrat von einer Spur eines rosafarbenen Pulvers mit 8 ml 5-n. Salzsäure angesäuert. Dabei entstand ein homogenes Gemisch, welches sich sofort emulgierte und dann bis zum folgenden Tag 3,5 g weisses, kristallinisches Pulver vom Schmp. ca. 130°–140° (–180°) ausschied. Dieses wurde mit 10 ml Wasser und 1 ml 1-n. Natronlauge versetzt, wonach das Gemisch mit 2 $\times$ 50 ml Äther behandelt wurde. Beim freiwilligen Verdunsten des Äthers wurden 1,3 + 0,3 = 1,6 g Rückstände erhalten, welche beim Kristallisieren aus 10 ml gew. Alkohol 1,1 g flache Prismen vom Schmp. 137°–138°,7 und $[\alpha]_D^{20} = +4^\circ,8$ (in Alkohol wie unten) ergaben. Nach erneuertem Umkristallisieren aus 40 ml 50 %-igem Alkohol bestand das Produkt aus 0,85 g Prismen vom Schmp. wie vorher, welche bei der Analyse die Zusammensetzung des Anhydrids einer Hydrazonobenzoyl-thiomilchsäure (Formel X, S. 37, $R = CH_3$, $R' = H$) zeigten.

Für $C_{10}H_{10}ON_2S$ (206,26):

ber.: C 58,23,	H 4,89,	N 13,58,	S 15,54 %,
gef.: C 58,25,	H 4,81,	N 13,63,	S 15,65 %.

Von dem analysierten Präparat zeigten 0,4738 g in abs. Alkohol auf 20,04 ml gelöst 2 $\alpha_D^{20} = +0^\circ,21$, $[\alpha]_D^{20} = +4^\circ,4$; es enthielt somit ein wenig von der einen aktiven Form im Überschuss.

Der vom Äther ungelöste Teil des Reaktionsproduktes wog 1,2 g und schmolz bei ca. 200°–212°. Beim Umkristallisieren aus 10 ml gew. Alkohol ergab es 0,7 g schmale Prismen vom Schmp. ca. 210°–213°, welche die Zusammensetzung einer anhydrierten *d*-Arabinose-hydrazonobenzoyl-thiomilchsäure (Formel X, S. 37, $R = CH_3$, $R' = C_5H_9O_4$) zeigten.

Für $C_{15}H_{18}O_5N_2S$ (338,37):

ber.: C 53,24, H 5,36, N 8,28, S 9,48 %,
 gef.: C 53,43, H 5,30, N 8,36, S 9,59 %.

Von diesem Präparat zeigten 0,4092 g in abs. Alkohol auf 20,04 ml gelöst $2\alpha_D^{20} = +4^\circ,46$, $[\alpha]_D^{20} = +109^\circ,2$.

Aus dem Filtrat des ursprünglichen Reaktionsproduktes wurden ungefähr wie bei dem Versuch mit Bromessigsäure oben 1,5 g *d*-Arabinose-thiobenzhydrazid vom Schmp. 167° – 168° und $[\alpha]_D^{20} = +37^\circ,7$ (Pyridin) gewonnen.

Aus 5,7 g *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid in 20 ml 1-n. Natronlauge und 3,1 g *d,l*- α -Brompropionsäure in 20,5 ml derselben Lauge wurden am folgenden Tag wie oben 4,6 g eines teigigen Pulvers erhalten. Das Filtrat davon wurde 2 Stunden auf dem Wasserbad erhitzt, wonach es beim Erkalten 0,25 g Hydrazonobenzoylthiomilchsäure-anhydrid als schmale Prismen ausschied. Diese schmolzen bei 136° – $137^\circ,5$, enthielten 15,50, ber. 15,54, % S und zeigten in abs. Alkohol $[\alpha]_D^{20} = -10^\circ,7$.

— Das zuerst ausgeschiedene Reaktionsprodukt wurde mit 2×50 ml Äther behandelt, wonach die ätherischen Lösungen bei freiwilliger Eindunstung 1,8 + 0,1 = 1,9 g Rückstände ergaben, welche zusammen aus 15 ml gew. Alkohol umkristallisiert wurden. Hierbei ergaben sie 0,75 g des obigen Anhydrids vom Schmp. 137° – 138° , mit 15,50 % S und in abs. Alkohol von $[\alpha]_D^{20} = -2^\circ,7$. — Der vom Äther ungelöste Teil des obigen Produktes wurde aus 20 ml gew. Alkohol umkristallisiert, wobei 1,65 g schmale, von dem Anhydrid der *l*-Arabinose-hydrazonobenzoylthiomilchsäure bestehende Prismen erhalten wurden, welche bei 211° – 213° schmolzen und 9,42, ber. 9,48, % S enthielten. Eine Lösung von 0,5068 g dieses Präparates in Pyridin zu 10,04 ml gelöst zeigte sofort und nach 3 Stunden $\alpha_D^{20} = -4^\circ,52$, $[\alpha]_D^{20} = -89^\circ,5$; eine in gelinder Wärme dargestellte Lösung von 0,4100 g davon in abs. Alkohol zu 20,04 ml zeigte $2\alpha_D^{20} = -4^\circ,43$, $[\alpha]_D^{20} = -108^\circ,3$. — Als 1,3 g dieses *l*-Arabinose-Derivates mit 60 ml Wasser erhitzt wurden, entstand eine klare Lösung, welche nach Zusatz von 6,7 ml 5-n. Salzsäure nach 2 Stunden auf dem Wasserbad 0,45 g des Anhydrids der Hydrazonobenzoylthiomilchsäure als schmale Prismen ausgeschieden hatte, welche bei 138° – 139° schmolzen, 15,48, ber. 15,54, % S enthielten und in abs. Alkohol $[\alpha]_D^{20} = +13^\circ,5$ zeigten. Die Mutterlauge davon lieferte bei fortgesetzt, 5 Stunden langem Erhitzen noch 0,2 g nadelförmige Prismen vom Schmp. 136° – 138° , mit 15,54 % S und wie oben in abs. Alkohol von $[\alpha]_D^{20} = +16^\circ,4$.

Eine mit 2,7 g Natriumhydroxyd in 50 ml Wasser bereitete Lösung von 19 g *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid wurde mit 20 g *d,l*- α -Brompropionsäure, welche mit 5,2 g Natriumhydroxyd in 100 ml Wasser neutralisiert worden war, versetzt, wonach das homogene Gemisch bis zum folgenden Tag nur eine Spur eines schlammartigen Pulvers absetzte. Das Filtrat davon ergab mit 35 ml 5-n. Salzsäure eine klare Lösung, welche sich schnell emulgierte und ein viskoses Öl ausschied. Die davon am nächsten Tag abdekantierte Lösung wurde dann mit 3×100 ml Äther extrahiert, und nach dem Trocknen der ätherischen Lösung mit geschmolzenem Chlorkalcium lieferte diese beim Abdestillieren des Äthers einen Rückstand von 5,4 g Gewicht. Aus diesem wurden dann 4,3 g α -Brompropionsäure vom Siedep.₉₇ 90° – 91° erhalten, welche $d_4^{20} = 1,696$, Äquiv. Gew. 154,2, ber. 153,0, und $0,5\alpha_D^{20} = -0^\circ,25$ zeigte. Hieraus erhält man $[\alpha]_D^{20} = -0^\circ,29$ oder 1,0 % des von RAMBERG (13) für die (-)- α -Brompropionsäure gefundenen, maximalen sp. Drehungsvermögens $[\alpha]_D^{20} = -29^\circ,0$. Von der hier erhaltenen Säure wurden 4 g mit 26 ml 1-n. Natronlauge neutralisiert und dann mit 4,2 g Kaliumxanthogenat versetzt, worauf die Lösung am

folgenden Tag auch mit 10 ml konz. Ammoniak versetzt wurde. Dabei trat bald Emulgierung ein, und ein Öl wurde ausgeschieden, welches nach dem Impfen mit O-Äthyl-xanthogenamid kristallinisch erstarrte. Nach freiwilligem Verdunsten des überschüssigen Ammoniaks wurde die Mutterlauge des Xanthogenamids mit Äther ausgeschüttelt und dann mit etwas Eisenchlorid-Lösung versetzt, wonach sie bis zur eingetretenen Entfärbung an der Luft belassen wurde. Nach Ansäuern mit 10 ml 5-n. Salzsäure, Ausschütteln mit 3×30 ml Äther und freiwilliger Abdunstung des Äthers wurden so 2,5 g eines grobkristallinen Gemisches von stereoisomeren Dithiodilactylsäuren erhalten, welches bei ca. 100° – 130° schmolz, das Äquiv.-Gew. 106,1, ber. 105,1, und für 0,8415 g in Wasser zu 20,04 ml gelöst $2 \alpha_D^{20} = +0^{\circ},32$ zeigte. Hieraus erhält man $[\alpha]_D^{20} = +3^{\circ},8$ oder 0,9 % des numerischen Wertes des von BERNTON (14) für die reine (-)-Dithiodilactylsäure in Wasser gefundenen sp. Drehungsvermögens $[\alpha]_D^{20} = -429^{\circ}$.

Bei einem mit dem vorigen analogen Versuch wurden 5,7 g *d*-Arabinose-thiobenzhydrazid in 40 ml 0,5-n. Natronlauge mit 6 g *d,l*- α -Brompropionsäure in 40 ml 1-n. Lauge umgesetzt und das Gemisch am folgenden Tag mit 15 ml 5-n. Salzsäure versetzt. Die dann von dem ausgeschiedenen Öl abdekantierte Lösung wurde dreimal mit 100 ml Äther extrahiert, wobei dieser durch $17,5 + 2,0 + 0,5 = 20$ ml 1-n. Natronlauge neutralisiert wurde und dann bei der freiwilligen Eindunstung nur 0,2 g eines farblosen Glases zurückblies. Die erhaltene, neutrale Lösung des Ätherauszugs ergab mit 6 ml 5-n. Salzsäure eine schwache Emulgierung und schied dabei etwas Öl aus, wonach der vom Öl separierten Flüssigkeit mit Äther Säuren, $14 + 1 = 15$ ml 1-n. Natronlauge entsprechend entzogen wurden. Die hierbei erhaltene, neutrale Wasserlösung wurde mit 2,4 g Kaliumxanthogenat versetzt, wonach ungefähr wie oben zum Schluss 1,0 g Dithiodilactylsäuren vom Schmp. ca. 100° – 125° , Äquiv.-Gew. 109,4 und $[\alpha]_D^{20} = -4^{\circ},9$ (in Wasser) daraus gewonnen wurden. — Das zuerst erhaltene, viskose Öl ging allmählich in ein etwas teigiges Pulver über, welches nach Zusatz von 10 ml Wasser und 2 ml 1-n. Natronlauge mit 2×50 ml Äther behandelt wurde. Die dabei entstandenen, ätherischen Lösungen ergaben bei der freiwilligen Eindunstung $0,9 + 0,3 = 1,2$ g Kristallreste, welche beim Umkristallisieren aus 10 ml gew. Alkohol 0,65 g Hydrazonobenzoyl-thiomilchsäureanhydrid als kleine Prismen vom Schmp. 137° – $138^{\circ},5$, mit 15,78, ber. 15,54, % S und für ihre Lösung in abs. Alkohol $[\alpha]_D^{20} = +4^{\circ},9$ ergaben. Der vom Äther ungelöste Teil wog 2,35 g, schmolz bei ca. 205° – 210° und zeigte in abs. Alkohol $[\alpha]_D^{20} = +110^{\circ},3$. Nach Umkristallisieren aus 30 ml gew. Alkohol bestand das so gewonnene Anhydrid der *d*-Arabinose-hydrazonobenzoyl-thiomilchsäure aus 1,8 g schmalen, fast nadelförmigen Prismen, welche bei 211° – 213° schmolzen und in abs. Alkohol $[\alpha]_D^{20} = +109^{\circ},0$ zeigten. Als 1,15 g davon mit 25 ml Wasser erhitzt wurden, entstand eine klare Lösung, welche nach 4-stündigem Erhitzen beim Erkalten 0,85 g flache Prismen vom Schmp. 211° – 213° und in abs. Alkohol mit $[\alpha]_D^{20} = +112^{\circ},7$ ausschied. — Eine Lösung von 0,3520 g dieses Präparates in 20 ml gew. Alkohol ergab einen schwachen Umschlag mit Phenolphthalein und 0,10 ml 0,1000-n. Natronlauge; nach Zusatz von 2,50 ml derselben Lauge trat nach einer Stunde mit 1,90 ml 0,1000-n. Salzsäure Entfärbung ein; nach Hinzufügung von noch 14,66 ml der Lauge wurden am folgenden Tag 4,55 ml der Säure verbraucht, was dem Äquiv.-Gew. 325,6, ber. 338,4, entspricht. — Der mit Äther extrahierte, wässrige Teil des ursprünglichen Reaktionsgemisches schied bei freiwilliger Eindunstung 0,9 g Kristalle vom Schmp. ca. 195° – 205° aus, welche beim Umkristallisieren aus 10 ml gew. Alkohol 0,4 g schmale Prismen vom Schmp. 211° – 213° und (in abs. Alkohol) $[\alpha]_D^{20} =$

+111°,1 lieferten. Die wässrige Mutterlauge davon ergab bei weiterer Bearbeitung und abschliessendem Zusatz von Thiobenzhydrazid 2 g rohes *d*-Arabinose-thiobenzhydrazid, welches nach dem Umkristallisieren aus gew. Alkohol bei 167°–168° schmolz und in Pyridin $[\alpha]_D^{20} = +37^{\circ},5$ zeigte.

2. Umsetzungen des *d*-Xylose-thiobenzhydrazids mit Haloidestern

Gegen Äthylbromid verhielt sich das *d*-Xylose-thiobenzhydrazid in alkalischer Alkohol-Wasserlösung wie das *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid. — Beim Versetzen einer Lösung von 5,7 g *d*-Xylose-thiobenzhydrazid in 20 ml 1-n. Natronlauge mit 2 g von mit derselben Lauge neutralisierter Monochloressigsäure entstand ein klares Gemisch, welches am folgenden Tag von 10 ml 5-n. Salzsäure bald emulgiert wurde und dann ein öliges Pulver ausschied. Bei der Behandlung dieses Pulvers mit Äther verblieb ein viskoses, im Vakuum über Phosphorsäureanhydrid glasig erstarrendes Öl ungelöst, und nach dem Neutralisieren der entstandenen, ätherischen Lösung mit 0,5 ml 1-n. Natronlauge lieferte sie bei der freiwilligen Eindunstung 1,4 g anhydrierte Hydrazonobenzoyl-thioglykolsäure vom Schmp. 134°–137°, die nach dem Umkristallisieren aus abs. Alkohol aus flachen Prismen oder schmalen Tafelchen vom Schmp. 140°–141° bestand und in abs. Alkohol kein Drehungsvermögen zeigte.

Aus 5,7 g *d*-Xylose-thiobenzhydrazid in 20 ml 1-n. Natronlauge und 3,1 g *d,l*- α -Brompropionsäure in 20,5 ml derselben Lauge wurde ein klares Gemisch erhalten, welches am nächsten Tag mit 6 ml 5-n. Salzsäure versetzt wurde. Hierbei wurde ein Öl ausgefällt, welches zu einer Kristallmasse erstarrte; beim Behandeln derselben mit 2 $\times$ 50 ml Äther verblieben 3,2 g Pulver ungelöst, während die ätherischen Lösungen 1,5 + 0,3 = 1,8 g Extrakt lieferten. Beim Umkristallisieren dieses Extraktes aus 10 ml gew. Alkohol wurden 0,7 g anhydrierte Hydrazonobenzoyl-thiomilchsäure als flache Prismen vom Schmp. 137°–138° erhalten, welche 15,52 %, ber. 15,54 %, S enthielten und für 0,4927 g in abs. Alkohol auf 20,04 ml gelöst 2 $\alpha_D^{20} = -0^{\circ},43$, $[\alpha]_D^{20} = -8^{\circ},7$, zeigten. — Von dem vom Äther ungelösten Pulver wurden 2,4 g in 10 ml abs. Alkohol in der Wärme gelöst und die Lösung wurde, da sie sich beim Erkalten nicht veränderte, mit 50 ml Wasser versetzt, wonach sie im Eisschrank bis zum folgenden Tag 1,3 g prismatische Kristalle absetzte. Diese verloren im Vakuum über Phosphorsäureanhydrid 5,11 % an Gewicht, schmolzen dann bei ca. 115°–123° und ergaben bei der Analyse:

Für $C_{15}H_{18}O_5N_2S$ (338,37):

ber.: C 53,24,	H 5,36,	N 8,28,	S 9,48 %,
gef.: C 53,27,	H 5,30,	N 8,20,	S 9,61 %.

Von diesem *d*-Xylose-hydrazonobenzoyl-thiomilchsäureanhydrid zeigten 0,4681 g in abs. Alkohol zu 10,04 ml gelöst sogleich und nach 7 Stunden $\alpha_D^{20} = -8^{\circ},03$, $[\alpha]_D^{20} = -172^{\circ},2$, und in Pyridin auf 10,04 ml gelöst ergaben 0,4266 g davon sofort und nach 6 Stunden $\alpha_D^{20} = -7^{\circ},75$, $[\alpha]_D^{20} = -182^{\circ},4$. — Beim Erhitzen von 1,1 g des Produktes auf dem Wasserbad mit 20 ml 0,5-n. Salzsäure entstand eine klare Lösung, welche sich allmählich emulgierte und ein Öl ausschied, das zum Schluss erstarrte und nach 2 Stunden 0,3 g wog, bei ca. 130°–135° schmolz und 15,02, ber. 15,54, % S enthielt. Dieses nicht ganz reine Hydrazonobenzoyl-thiomilchsäureanhydrid zeigte in abs. Alkohol $[\alpha]_D^{20} = -14^{\circ},6$.

Bei einem neuen Versuch wie oben, aber mit 6,2 g *d,l*- α -Brompropionsäure in

40 ml 1-n. Lauge wurde am folgenden Tag beim Ansäuern mit 15 ml 5-n. Salzsäure ein Öl ausgeschieden, welches bei Behandlungen mit $50 + 3 \times 25$ ml Äther 4 g eines ungelösten Pulvers lieferte, während der Äther zum Neutralisieren 6 ml 1-n. Lauge verbrauchte und dann bei der freiwilligen Eindunstung 0,8 g einer kristallinen Masse zurückliess. Bei der Umkristallisation aus 4 ml gew. Alkohol wurden hieraus 0,35 g Hydrazonobenzoyl-thiomilchsäure-anhydrid als farblose Prismen erhalten, welche bei 138° – 139° schmolzen, 13,67 % N und 15,50 % S, ber. 13,58 % N und 15,54 % S, enthielten und für 0,3010 g in abs. Alkohol zu 20,04 ml gelöst $2 \alpha_D^{20} = -0^{\circ},32$, $[\alpha]_D^{20} = -10^{\circ},7$ zeigten. — Die von dem flüssigen Reaktionsprodukt abdekantierte Wasserlösung wurde dreimal mit 50 ml Äther extrahiert, wonach dieser $13,5 + 1,5 + 0,5 = 15,5$ ml 1-n. Lauge verbrauchte. Die hierbei erhaltene, neutrale Wasserlösung wurde mit der oben erhaltenen vereinigt, wonach das Gemisch mit 6 ml 5-n. Salzsäure ein wenig Öl ausschied. Die davon abdekantierte Lösung wurde aufs neue mit Äther extrahiert, wobei ihr Säuren, entsprechend 12 ml 1-n. Lauge, entzogen wurden; nach dem Versetzen der hierbei erhaltenen, neutralen Lösung mit 1,9 g Kaliumxanthogenat usw. wurden zum Schluss 0,9 g Dithiodilactylsäuren gewonnen, welche bei ca. 110° – 125° schmolzen und das Äquiv.-Gew. 105,8 sowie (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = +7^{\circ},7$ zeigten.

Das bei der Behandlung des ursprünglichen, ölförmigen Reaktionsproduktes mit Äther ungelöste Pulver schmolz bei ca. 80° – 112° und verlor im Vakuum über Phosphorsäureanhydrid 4,0 % an Gewicht, wonach es bei ca. 110° – 120° schmolz und für 0,5088 g in abs. Alkohol zu 10,04 ml gelöst sofort und nach 5 Stunden $\alpha_D^{20} = -8^{\circ},52$, $[\alpha]_D^{20} = -168^{\circ},1$, zeigte. Beim Umkristallisieren von 3,1 g davon aus 20 ml Alkohol und 60 ml Wasser wie oben wurden 1,7 g farblose, kleine Prismen erhalten, welche wie oben 4,56 % an Gewicht verloren, dann bei 117° – 121° schmolzen und gemäss der Analyse aus *d*-Xylose-hydrazonobenzoyl-thiomilchsäure-anhydrid bestanden:

Für $C_{15}H_{18}O_5N_2S$ (338,37):

ber.: C 53,24,	H 5,36,	N 8,28,	S 9,48 %,
gef.: C 53,22,	H 5,28,	N 8,35,	S 9,54 %.

0,4213 g getrocknete Sbst. in abs. Alkohol zu 10,04 ml gelöst zeigten $\alpha_D^{20} = -7^{\circ},28$, $[\alpha]_D^{20} = -173^{\circ},5$.

Nach freiwilliger Eindunstung der Mutterlauge und Erwärmen bis zur Auflösung der dabei abgeschiedenen Effloreszenzen wurden beim Erkalten 0,8 g Prismen erhalten, welche wie oben 4,46 % an Gewicht verloren und dann bei 115° – 118° schmolzen, 8,32 % N sowie 9,59 % S enthielten und in abs. Alkohol $[\alpha]_D^{20} = -172^{\circ},8$ zeigten.

3. Umsetzungen des *l*-Rhamnose-thiobenzhydrazids mit Haloidestern

Beim Versetzen einer Lösung von 4,0 g *l*-Rhamnose-thiobenzhydrazid in 13,5 ml 1-n. Natronlauge mit 2,0 g Äthylbromid in 13 ml Alkohol entstand ein homogenes Gemisch, welches den folgenden Tag unverändert war und dann bei der freiwilligen Eindunstung ein viskoses Öl ausschied. Dieses ging zum Schluss in 4,2 g einer Kristallmasse vom Schmp. ca. 130° – 134° über, welche in abs. Alkohol $[\alpha]_D^{20} = +4^{\circ},3$ zeigte. Nach dem Auflösen des Restes des Produktes in der erwärmten, polarimetrischen Lösung, schied diese beim Erkalten 2,6 g *l*-Rhamnose-S-äthyl-isothiobenzhydrazid als eine kompakte Masse von Täfelchen vom Schmp. 137° – 138° aus.

Für $C_{15}H_{22}O_4N_2S$ (326,40):

ber.: C 55,19,	H 6,79,	N 8,58,	S 9,82 %,
gef.: C 55,37,	H 6,81,	N 8,61,	S 9,83 %.

Von dem umkristallisierten Produkt zeigten 0,5234 g in abs. Alkohol zu 10,04 ml gelöst $\alpha_D^{20} = +0^\circ,19$, $[\alpha]_D^{20} = +3^\circ,6$ und $[M]_D^{20} = +11^\circ,7$. — 1,002 g in Pyridin zu 20,04 ml gelöst zeigten 2 $\alpha_D^{20} = +0^\circ,12$, $[\alpha]_D^{20} = +1^\circ,2$ und $[M]_D^{20} = +3^\circ,9$.

Nach Versetzen einer Lösung von 4,5 g *l*-Rhamnose-thiobenzhydrazid in 15 ml 1-n. Natronlauge mit 1,6 g *Monochloressigsäure* in 17 ml derselben Lauge entstand ein homogenes Gemisch, welches bis zum folgenden Tag nur eine Spur eines schlammartigen Pulvers ausschied. Das Filtrat davon lieferte mit 6 ml 5-n. Salzsäure eine klare Lösung, welche nach einigen Minuten emulgiert wurde und dann in einen Brei aus schmalen Prismen des Hydrazonobenzoyl-thioglykolsäure-anhydrids vom Schmp. 137° – 138° überging. Das Filtrat davon wurde gegen Lackmus mit 14 ml 1-n. Natronlauge neutralisiert, und nach freiwilliger Eindunstung bis zur beginnenden Ausscheidung von Kochsalz wurde etwas Wasser zugesetzt, ein wenig eines ausgeschiedenen Pulvers abfiltriert und das Filtrat von 15 ml Volumen mit 2,3 g Thiobenzhydrazid in 15 ml Alkohol versetzt. Hierbei entstand ein homogenes Gemisch, welches den folgenden Tag 3,0 g *l*-Rhamnose-thiobenzhydrazid als haarfeine Nadeln vom Schmp. 175° – 176° und $[\alpha]_D^{20} = -10^\circ,8$ (in Pyridin) ausgeschieden hatte.

Aus 6 g *l*-Rhamnose-thiobenzhydrazid in 20 ml 1-n. Natronlauge und 3,2 g *d,l*-*Brompropionsäure* in 20,5 ml derselben Lauge wurden wie oben am folgenden Tag mit 6 ml 5-n. Salzsäure 5 g einer zuerst als Öl abgeschiedenen, dann kristallinisch erstarrten Masse erhalten, während die Mutterlauge nach dem Neutralisieren mit Natronlauge usw. wie oben mit 1,5 g Thiobenzhydrazid 2,3 g haarfeine Nadeln vom Schmp. 176° – 177° und (in Pyridin) von $[\alpha]_D^{20} = -10^\circ,3$ lieferte. — Die mit Salzsäure erhaltene Kristallmasse wurde mit 3×50 ml Äther behandelt, wonach 2,7 g davon ungelöst verblieben, während die Ätherlösungen 1,9 g Eindunstungsrückstände lieferten, welche beim Umkristallisieren aus 15 ml gew. Alkohol 1,1 g Hydrazonobenzoyl-thiomilchsäure-anhydrid vom Schmp. 137° – 138° , mit 15,51, ber. 15,54, % S und von $[\alpha]_D^{20} = -1^\circ,5$ (in abs. Alkohol) ergaben. — Das vom Äther ungelöste Pulver ergab mit 30 ml heissem, gew. Alkohol eine gelbe Lösung, welche beim Erkalten 1,2 g nadelförmige Prismen von *l*-Rhamnose-hydrazonobenzoyl-thiomilchsäure-anhydrid vom Schmp. 198° – 200° à 201° ausschied.

Für $C_{16}H_{20}O_5N_2S$ (352,40):

ber.: C 54,53,	H 5,72,	N 7,95,	S 9,10 %.
gef.: C 54,55,	H 5,65,	N 8,14,	S 9,28 %.

Von diesem Präparat zeigten 0,5063 g in Pyridin auf 10,04 ml gelöst sogleich und nach 2 Stunden $\alpha_D^{20} = -4^\circ,55$, $[\alpha]_D^{20} = -90^\circ,2$ und $[M]_D^{20} = -317^\circ,9$.

Bei einem neuen Versuch wie oben, aber mit 6,2 g der Brompropionsäure in 40,5 ml 1-n. Natronlauge, wurde mit 12 ml 5-n. Salzsäure ein klares Gemisch erhalten, welches nach einigen Minuten emulgiert wurde und ein Öl ausschied, das dann in 5,5 g Kristallpulver überging. Das Filtrat davon wurde mit 2×50 ml Äther extrahiert, wonach die Ätherlösungen von $19 + 1,5 = 20,5$ ml 1-n. Lauge neutralisiert wurden, und aus der so erhaltenen, neutralen Lösung von unverbrauchter Brompropionsäure in der gewöhnlichen Weise zum Schluss 1,4 g Dithiodilactylsäuren erhalten wurden. Diese schmolzen bei ca. 105° – 130° und zeigten das Äquiv.-

Gew. 107,2 sowie für 0,9527 g in Wasser zu 20,04 ml gelöst $2 \alpha_D^{20} = +0^\circ,03$, $[\alpha]_D^{20} = +0^\circ,3$. — Das von der Salzsäure ausgefällte, ursprüngliche Reaktionsprodukt wurde mit insgesamt 100 ml Äther behandelt, wobei ihm 1,8 g Hydrazonobenzoyl-thiomilchsäure-anhydrid entzogen wurden, welches nach dem Umkristallisieren aus Alkohol bei 137° – 138° schmolz, 16,16, ber. 15,54, % S enthält und in abs. Alkohol $[\alpha]_D^{20} = -3^\circ,1$ zeigte. Der vom Äther ungelöste Teil wurde aus 40 ml gew. Alkohol umkristallisiert und ergab dabei 1,8 g *l*-Rhamnose-hydrazonobenzoyl-thiomilchsäure-anhydrid als haarfeine Nadeln vom Schmp. 198° – 201° , mit 7,94 % N und 9,07 % S, ber. 7,95 % N und 9,10 % S, und mit $[\alpha]_D^{20} = -89^\circ,1$ (Pyridin).

4. Umsetzungen des *d*-Glucose-thiobenzhydrazids mit Haloidestern

Gegen *Äthylbromid* verhielt sich das *d*-Glucose-thiobenzhydrazid wie das *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid.

Beim Umsatz von 6,3 g *d*-Glucose-thiobenzhydrazid in 20 ml 1-n. Natronlauge mit 3,1 g *d,l*- α -Brompropionsäure in 20,2 ml derselben Lauge ergab am folgenden Tag das Filtrat von einer Spur eines schlammartigen Pulvers mit 6 ml 5-n. Salzsäure ein homogenes Gemisch, welches bis zum folgenden Tag nur 0,15 g kleine Prismen vom Schmp. 137° – 138° ausschied. Das Filtrat davon ergab bei der freiwilligen Eindunstung eine sirupöse Masse, welche in 25 ml Wasser gelöst wurde, wonach die Lösung sich während einer Stunde auf dem Wasserbad praktisch nicht veränderte. Nach Zusatz von 5 ml 5-n. Salzsäure schied es während einer weiteren Stunde auf dem Wasserbad ein Öl aus, welches beim Erkalten 0,8 g Hydrazonobenzoyl-thiomilchsäure-anhydrid vom Schmp. 135° – 137° und in abs. Alkohol von $[\alpha]_D^{20} = -1^\circ,6$ ausschied. Nach Umkristallisieren aus 5 ml gew. Alkohol bestand das Produkt aus 0,5 g Kristallen vom Schmp. 137° – $138^\circ,5$, mit 15,57, ber. 15,54, % S und für 0,4447 g in abs. Alkohol zu 20,04 ml gelöst $2 \alpha_D^{20} = -0^\circ,08$, $[\alpha]_D^{20} = -1^\circ,8$. — Das Filtrat des Rohproduktes wurde noch 2 Stunden erhitzt, wobei eine braune Kristallmasse von 1,6 g Gewicht erhalten wurde, welche beim Umkristallisieren aus 10 ml gew. Alkohol 0,6 g immer noch verfärbte Prismen vom Schmp. 137° – $138^\circ,5$ lieferte. Das Filtrat dieses Produktes ergab mit 3 g Thiobenzhydrazid in 10 ml Alkohol 3,2 g *d*-Glucose-thiobenzhydrazid als farblose Nadeln vom Schmp. 180° – 182° , nach Umkristallisieren aus gew. Alkohol vom Schmp. 182° – 183° und (in Pyridin) von $[\alpha]_D^{20} = -41^\circ,5$.

Nach dem Umsatz von 6,3 g *d*-Glucose-thiobenzhydrazid in 20 ml 1-n. Natronlauge mit 6,1 g der Brompropionsäure in 40,4 ml derselben Lauge wurde wie oben mit 15 ml 5-n. Salzsäure ein homogenes Gemisch erhalten, welches mit 2×100 ml Äther extrahiert wurde, wobei der Lösung Säuren, entsprechend $19,5 + 1,5 = 21,0$ ml 1-n. Lauge entzogen wurden. Die so erhaltene, neutrale Wasserlösung wurde von 6 ml 5-n. Salzsäure schwach emulgiert und schied dann etwas Öl aus. Die davon abdekantierte Lösung ergab beim Ausäthern Säuren, entsprechend 16,5 ml 1-n. Lauge, und nach dem Umsatz der hierbei erhaltenen, neutralen Lösung mit 2,6 g Kaliumxanthogenat usw. wurden zum Schluss 1,2 g Dithiodilactylsäuren erhalten, welche bei ca. 105° – 130° schmolzen und das Äquiv.-Gew. 106,5 und $[\alpha]_D^{20} = +4^\circ,7$ (in Wasser) zeigten. — Aus der mit Äther extrahierten, ursprünglichen Reaktionslösung wurden nach freiwilliger Eindunstung, Zusatz von mehr Salzsäure und Erhitzen auf dem Wasserbad 0,8 g Hydrazonobenzoyl-thiomilchsäure-anhydrid als cremefarbene Prismen vom Schmp. 134° – 136° , mit 15,33, ber. 15,54, % S und für 0,5013 g in abs. Alkohol zu 20,04 ml gelöst $2 \alpha_D^{20} = -0^\circ,20$, $[\alpha]_D^{20} = -4^\circ,0$, erhalten.

Aus einem Gemisch von 31,4 g *d*-Glucose-thiobenzhydrazid in 100 ml 1-n. Natronlauge und 30,6 g *d,l*- α -Brompropionsäure in 100 ml 2-n. Natronlauge wurde bis zum folgenden Tag nur eine Spur eines schlammartigen Pulvers abgesetzt. Das Filtrat davon schied mit 20 g Schwefelsäure in etwas Wasser ein auch im Eisschrank nicht kristallisierendes Öl aus; die davon abdekantierte Wasserlösung ergab beim Ausäthern usw. zum Schluss 5 g unverbrauchte Brompropionsäure vom Siedep.₁₂ = 97°–98° und $0,5 \alpha_D^{20} = -0^{\circ},24$. Aus dem erhaltenen Öl wurden nach Behandlung mit Natronlauge, Abfiltrieren einer Spur dabei ungelösten Pulvers, Ansäuern und Ausäthern noch 4,5 g Brompropionsäure vom Siedep. wie oben und $0,5 \alpha_D^{20} = -0^{\circ},30$ gewonnen; und als 8 g der vereinigten Destillate zu einer mit Schwefelwasserstoff gesättigten Lösung von 5 g Natriumhydroxyd in 25 ml Wasser versetzt worden waren, wurde aus dem am folgenden Tag mit 12 g Schwefelsäure in etwas Wasser angesäuerten Reaktionsgemisch durch Ausäthern usw. zum Schluss 4 g Thiomilchsäure vom Siedep.₁₂ = 102°–103° erhalten, welche gegen Neutralrot das Äquiv.-Gew. 108,7 und gegen Jod-Lösung 107,2 ergab und das Drehungsvermögen $0,5 \alpha_D^{20} = +0^{\circ},35$ zeigte, während BERNTON (15) für die reine (+)-thiomilchsäure $0,5 \alpha_D^{20} = +26^{\circ},8$ gefunden hatte.

5. Umsetzungen des *d*-Mannose-thiobenzhydrazids mit Haloidestern

Eine Lösung von 3,15 g *d*-Mannose-thiobenzhydrazid in 10 ml 1-n. Natronlauge lieferte mit 1,5 g Äthylbromid in 10 ml Alkohol ein homogenes Gemisch, welches am folgenden Tag unverändert war und dann beim freiwilligen Eindunsten 2,9 g einer grobkristallinen Kruste vom Schmp. 141°–143° und (in Pyridin) $[\alpha]_D^{20} = +27^{\circ},1$ ausschied. Beim Umkristallisieren von 2,2 g dieses Produktes aus 10 ml gew. Alkohol wurden 1,1 g glasklare, schmale Täfelchen oder flache Prismen vom Schmp. 143°–144° gewonnen.

Für $C_{15}H_{22}O_5N_2S$ (342,40):

ber.: C 52,61,	H 6,48,	N 8,18,	S 9,36 %.
gef.: C 52,73,	H 6,54,	N 8,23,	S 9,39 %.

Von dem so gereinigten *d*-Mannose-S-äthyl-isothiobenzhydrazid zeigten 0,4627 g in Pyridin auf 10,04 ml gelöst sofort und nach 3 Stunden $0,947 \alpha_D^{20} = +1^{\circ},23$, $[\alpha]_D^{20} = +28^{\circ},2$ und $[M]_D^{20} = +96^{\circ},6$. Eine in gelinder Wärme dargestellte Lösung von 0,5054 g derselben Verbindung in abs. Alkohol auf 10,04 ml Volumen zeigte sofort $0,947 \alpha_D^{20} = +0^{\circ},80$, $[\alpha]_D^{20} = +16^{\circ},8$ und $[M]_D^{20} = +57^{\circ},5$, wonach bald Kristallisation eintrat.

Ein Gemisch aus 3,2 g *d*-Mannose-thiobenzhydrazid in 10 ml 1-n. Natronlauge und 1,2 g Monochloressigsäure in 13 ml derselben Lauge schied bis zum folgenden Tag nur eine Spur eines schlammartigen Pulvers aus; das Filtrat davon lieferte mit 10 ml 2-n. Salzsäure eine klare Lösung, welche nach ein Paar Minuten sich zu trüben begann und dann bis zum folgenden Tag in einen Brei aus farnartig aggregierten, flachen Prismen überging. Nach Absaugen, Waschen mit 10 ml Wasser und Trocknen an der Luft wog das Produkt 1,8 g, schmolz bei 134°–136° und enthielt 15,32 % S, während das Anhydrid der Hydrazonobenzoyl-thioglykolsäure 16,68 % S erfordert. Nach zweimaliger Umkristallisation aus Alkohol schmolz das Produkt bei 137°–138°, enthielt aber immer noch zu wenig, nämlich 15,81 %, Schwefel. — Die Mutterlauge

des ursprünglichen Rohproduktes wurde mit 50 ml Äther extrahiert, wonach dieser 3,0 ml 1-n. Lauge verbrauchte und dann fast keinen Eindunstungsrückstand lieferte. Die extrahierte Lösung wurde mit 1,5 g Thiobenzhydrazid in 10 ml Alkohol versetzt und schied dann bis zum folgenden Tag 2,4 g *d*-Mannose-thiobenzhydrazid vom Schmp. 191°–192° und mit 10,41, ber. 10,20, % S aus.

Aus 6,3 g *d*-Mannose-thiobenzhydrazid in 20 ml 1-n. Natronlauge und 3,1 g *d,l*- α -Brompropionsäure in 20,3 ml derselben Lauge wurde eine Lösung erhalten, welche wie oben mit 6 ml 5-n. Salzsäure ein homogenes Gemisch lieferte, woraus bis zum folgenden Tag 3,8 g mit 10 ml Wasser gewaschenes Kristallpulver ausgeschieden wurden. Das Filtrat davon setzte im Laufe von ein Paar Tagen 0,3 g Warzen vom Schmp. ca. 120°–130° ab, und ergab dann nach 2-stündigem Erhitzen auf dem Wasserbad 0,35 g schmale Prismen vom Schmp. 136°,5–137°,5 und mit 15,47 % S, die in abs. Alkohol $[\alpha]_D^{20} = -27°,8$ zeigten. — Das Filtrat davon lieferte mit 3 g Thiobenzhydrazid in 30 ml Alkohol 3,9 g *d*-Mannose-thiobenzhydrazid vom Schmp. 185°–187°, nach wiederholtem Auskochen mit Alkohol 3,6 g vom Schmp. 190°–191° und mit 10,35, ber. 10,20, % S. — Das zuerst ausgeschiedene Reaktionsprodukt wurde mit 2 $\times$ 50 ml Äther behandelt, wonach die ätherischen Lösungen bei der freiwilligen Eindunstung 1,4 + 0,6 = 2,0 g einer Kristallmasse zurückliessen, welche beim Umkristallisieren aus 15 ml gew. Alkohol 1,55 g schmale Prismen von Hydrazonobenzoyl-thiomilchsäure-anhydrid lieferte. Dieses Präparat schmolz bei 138°–139°, enthielt 15,45, ber. 15,54, % S; 0,4918 g davon in abs. Alkohol auf 20,04 ml gelöst zeigten 2 $\alpha_D^{20} = +0°,07$, $[\alpha]_D^{20} = +1°,4$. — Der vom Äther ungelöste Rest wog 1,5 g und ergab beim Umkristallisieren aus 12 ml gew. Alkohol 1,0 g schmale Prismen von *d*-Mannose-hydrazonobenzoyl-thiomilchsäure vom Schmp. 175°–180°, mit 50,82 % C und 5,53 % H, ber. 49,73 % C und 5,74 % H, und (in Pyridin) von $[\alpha]_D^{20} = +78°,7$.

Bei einem neuen Versuch wie oben, aber mit 6,2 g Brompropionsäure in 40,5 ml 1-n. Natronlauge, schieden am folgenden Tag 15 ml 5-n. Salzsäure 3,7 g einer etwas teigigen Kristallmasse aus. Das Filtrat lieferte bei zweimaligen Extraktionen mit 100 ml Äther Säuren, entsprechend 17,5 + 1,0 = 18,5 ml 1-n. Lauge; die hierbei erhaltene, neutrale Wasserlösung wurde von 5 ml 5-n. Salzsäure emulgiert, wonach sie ein wenig Öl ausschied. Die von dem Öl separierte Lösung wurde von neuem mit Äther extrahiert und lieferte dabei Säuren, entsprechend 17 ml Lauge, wonach die erhaltene, neutrale Wasserlösung nach Zusatz von 2,7 g Kaliumxanthogenat usw. zum Schluss 1,4 g eines Dithiodilactylsäure-Gemisches ergab, welches bei ca. 105°–130° schmolz, das Äquiv.-Gew. 106,5 und für 0,8727 g in Wasser auf 20,04 ml gelöst 2 $\alpha_D^{20} = +0°,12$, $[\alpha]_D^{20} = +1°,4$ zeigte. — Die mit Äther extrahierte, ursprüngliche Reaktionslösung wurde 2 Stunden auf dem Wasserbad erhitzt, wobei sie 0,7 g Hydrazonobenzoyl-thiomilchsäure-anhydrid als nadelförmige Prismen vom Schmp. 137°–138°, mit 15,54, ber. 15,54, % S und (in abs. Alkohol) von $[\alpha]_D^{20} = -25°,0$, ausschied. — Das zuerst erhaltene, etwas teigige Reaktionsprodukt ergab bei Behandlungen mit 2 $\times$ 50 ml Äther 1,5 g herausgelöste Kristallmassen, welche beim Umkristallisieren aus 15 ml gew. Alkohol 0,8 g schmale Prismen des obigen Anhydrids vom Schmp. 137°,5–138°,5, mit 15,50 % S und (in abs. Alkohol) von $[\alpha]_D^{20} = +2°,0$ lieferten. Der vom Äther ungelöste Teil wog 2,1 g und ergab beim Umkristallisieren aus 20 ml gew. Alkohol 1,15 g nadelförmige Prismen vom Schmp. 179°–180°, welche gemäss der Analyse hauptsächlich aus *d*-Mannose-hydrazonobenzoyl-thiomilchsäure bestanden:

Für $C_{16}H_{22}O_7N_2S$ (386,42):

ber.:	C 49,73,	H 5,74,	N 7,25,	S 8,30 %.
gef.:	C 50,86,	H 5,54,	N 7,58,	S 8,49 %.

Von diesem Produkt zeigten 0,4845 g in Pyridin zu 10,04 ml gelöst sofort und nach 3 Stunden $\alpha_D^{20} = +3^{\circ},87$, $[\alpha]_D^{20} = +80^{\circ},2$.

6. Umsetzungen des *d*-Galaktose-thiobenzhydrazids mit Haloidestern

Gegen *Äthylbromid* verhielt sich das *d*-Galaktose-thiobenzhydrazid wie die entsprechende Verbindung der *l*-Arabinose. — Ein Gemisch aus 3,2 g des *d*-Galaktose-thiobenzhydrazids in 10 ml 1-n. Natronlauge und 1,2 g *Monochloressigsäure* in 13 ml derselben Lauge schied bis zum folgenden Tag nur eine Spur eines Pulvers aus, und das Filtrat davon ergab mit 10 ml 2-n. Salzsäure eine klare Lösung, welche den nächsten Tag 0,7 g Hydrazonobenzoyl-thioglykolsäure-anhydrid als flache Prismen vom Schmp. 138° – 140° und mit 16,51, ber. 16,68, % S ausgeschieden hatte. Das Filtrat davon lieferte nur sehr wenig Ätherextrakte; als es dann auf dem Wasserbad 2 Stunden erhitzt wurde, trat Emulgierung und Abscheidung eines Kristallpulvers ein, welches nach dem Erkalten 0,7 g wog, bei 139° – 141° schmolz und 16,51 % S enthält. Das neue Filtrat gab dann mit 1,5 g Thiobenzhydrazid in 5 ml Alkohol 2,6 g Kristalle von zurückgebildetem *d*-Galaktose-thiobenzhydrazid vom Schmp. 174° – 175° und $[\alpha]_D^{20} = -37^{\circ},2$ (in Pyridin).

Nach dem Umsatz von 6,3 g *d*-Galaktose-thiobenzhydrazid in 20 ml 1-n. Natronlauge mit 3,1 g *d,l*- α -Brompropionsäure in 20,3 ml derselben Lauge ergab am folgenden Tag das Filtrat von einer Spur eines schlammartigen Pulvers mit 6 ml 5-n. Salzsäure ein homogenes Gemisch, welches sich schnell emulgierte und dann 0,95 g Hydrazonobenzoyl-thiomilchsäure-anhydrid als Sternchen aus flachen Prismen vom Schmp. 137° – 138° ausschied. Das Produkt enthielt 15,47, ber. 15,54, % S und zeigte in abs. Alkohol $[\alpha]_D^{20} = +5^{\circ},9$. Die Mutterlauge wurde mit 50 ml Äther extrahiert, wonach dieser nur 1,1 ml 1-n. Lauge verbrauchte und danach einen Eindunstungsrückstand von 0,15 g Gewicht lieferte. Die extrahierte Lösung emulgierte sich allmählich beim Erhitzen auf dem Wasserbad und nach 3 Stunden und Erkalten wurden daraus 1,1 g kleine Prismen vom Schmp. wie oben, mit 15,44 % S und in abs. Alkohol von $[\alpha]_D^{20} = -7^{\circ},6$ gewonnen. — Bei einem neuen Versuch wie oben, aber mit 6,2 g Brompropionsäure in 40,5 ml 1-n. Natronlauge, wurden am nächsten Tag mit 15 ml 5-n. Salzsäure 0,8 g einer schwach öligen Kristallmasse erhalten, welche beim Umkristallisieren aus 10 ml gew. Alkohol 0,45 g Hydrazonobenzoyl-thiomilchsäure-anhydrid vom Schmp. 137° – 138° , mit 15,46 % S und in abs. Alkohol von $[\alpha]_D^{20} = +4^{\circ},0$ lieferte. Das Filtrat des obigen Rohproduktes wurde mit 2×100 ml Äther ausgeschüttelt, wonach dieser $20 + 1,5 = 21,5$ ml 1-n. Lauge verbrauchte und dann nur 0,1 g Eindunstungsrückstand lieferte. Die neutrale Wasserlösung wurde von Salzsäure emulgiert und schied dann 0,6 g eines Öles aus; die davon separierte Lösung ergab bei neuer Extraktion mit Äther Säuren, entsprechend 18 ml 1-n. Lauge. Nach dem Umsatz mit 2,9 g Kaliumxanthogenat ergaben diese Säuren ein Gemisch aus Dithiodilactylsäuren, welches bei ca. 105° – 130° schmolz, das Äquiv.-Gew. 106,7 wies und von dem 0,3448 g in Wasser zu 20,04 ml gelöst $2 \alpha_D^{20} = +0^{\circ},16$, $[\alpha]_D^{20} = +4^{\circ},6$ zeigten. — Die mit Äther extrahierte, ursprüngliche Reaktionslösung emulgierte sich beim Erhitzen auf dem Wasserbad und ergab dabei

im Laufe von 2 Stunden und nach Erkalten 1,3 g Hydrazonobenzoyl-thiomilchsäure-anhydrid als eine etwas klebrige Kristallmasse, welche beim Umkristallisieren aus 10 ml gew. Alkohol 0,9 g schmale Prismen vom Schmp. $137^{\circ},5$ – $138^{\circ},5$, mit 15,43, ber. 15,54, % S und in abs. Alkohol von $[\alpha]_D^{20} = -4^{\circ},3$ lieferte.

7. Umsetzungen des *d*-Fructose-thiobenzhydrazids mit Haloidestern

Aus *d*-Fructose-thiobenzhydrazid und *Äthylbromid* konnten keine kristallisierten Reaktionsprodukte erhalten werden. — Aus 3,2 g desselben Thiohydrazids in 10 ml 1-n. Natronlauge und 1,3 g *Monochloressigsäure* in 13 ml derselben Lauge wurde ein klares Gemisch erhalten, welches bis zum folgenden Tag nur eine Spur eines schlammartigen Pulvers ausschied. Das Filtrat davon ergab mit 10 ml 2-n. Salzsäure eine klare Lösung, welche sich schnell emulgierte und dann 1,85 g Hydrazonobenzoyl-thioglykolsäure-anhydrid als flache Prismen vom Schmp. 139° – $140^{\circ},5$ und mit 16,61, ber. 16,68, % S ausschied. Die Mutterlauge wurde mit 50 ml Äther ausgeschüttelt, wonach dieser durch 2,5 ml 1-n. Lauge neutralisiert wurde und dann praktisch keinen Eindunstungsrest lieferte. Die extrahierte Lösung wurde mit 1,5 g Thiobenzhydrazid in 10 ml Alkohol versetzt und schied dann im Laufe von zwei Tagen 1,6 g eines Kristallpulvers aus, welches mit 20 ml 0,5-n. Natronlauge geschüttelt wurde. Nach dem Abfiltrieren von 0,1 g ungelösten Pulvers vom Schmp. ca. 135° – 137° ergab das Filtrat mit 10 ml 2-n. Salzsäure 1,3 g *d*-Fructose-thiobenzhydrazid vom Schmp. 174° – 175° und (in Pyridin) von $[\alpha]_D^{20} = +23^{\circ},5$.

Nach Umsatz von 6,3 g *d*-Fructose-thiobenzhydrazid in 20 ml 1-n. Natronlauge mit 3,1 g *d,l*- α -Brompropionsäure in 20,1 ml derselben Lauge wurden wie oben mit 6 ml 5-n. Salzsäure 3,9 g Hydrazonobenzoyl-thiomilchsäure-anhydrid gewonnen, welches bei ca. 135° – 137° schmolz, 15,22, ber. 15,54, % S enthielt und in abs. Alkohol kein Drehungsvermögen zeigte. Nach Umkristallisieren aus 20 ml gew. Alkohol ergab das Produkt 2,8 g Kristalle vom Schmp. 138° – 139° , mit 15,48 % S und ebenfalls ohne optische Aktivität. — Das Filtrat des Rohproduktes wurde mit 50 ml Äther extrahiert, wonach dieser 1,3 ml 1-n. Lauge verbrauchte und danach einen sehr unbedeutenden Eindunstungsrückstand lieferte. Die extrahierte Lösung wurde auf dem Wasserbad nur schwach getrübt und nach dem Erkalten wurden aus dem Filtrat von einer Spur eines bräunlichen Pulvers mit 3 g Thiobenzhydrazid in 25 ml Alkohol 3,3 g *d*-Fructose-thiobenzhydrazid gewonnen, welches nach Reinigung wie oben bei 171° – 172° schmolz und (in Pyridin) $[\alpha]_D^{20} = +23^{\circ},9$ zeigte.

Bei einem Versuch wie dem vorigen, aber mit 6,2 g der Brompropionsäure in 40,4 ml 1-n. Natronlauge, wurden mit 15 ml 5-n. Salzsäure 4,0 g eines Hydrazonobenzoyl-thiomilchsäure-anhydrids vom Schmp. 135° – 137° , mit 15,43 % S und in abs. Alkohol von $[\alpha]_D^{20} = +4^{\circ},4$ erhalten. Beim Umkristallisieren aus 20 ml abs. Alkohol wurden hieraus 3,1 g Prismen erhalten, welche bei 137° – 138° schmolzen, 15,48 % S enthielten und in abs. Alkohol $[\alpha]_D^{20} = +2^{\circ},9$ zeigten. — Das Filtrat ergab beim Verarbeiten wie üblich eine, 16,5 ml 1-n. Lauge entsprechende Menge unverbrauchter Brompropionsäure; aus dieser und 2,6 g Kaliumxanthogenat wurden zum Schluss 1,4 g Dithiodilactylsäuren gewonnen, welche bei ca. 105° – 125° schmolzen und das Äquiv.-Gew. 105,9 zeigten. Hiervon zeigten 0,9434 g in Wasser auf 20,04 ml gelöst $2 \alpha_D^{20} = -0^{\circ},95$, $[\alpha]_D^{20} = -10^{\circ},1$.

8. *d*-Sedoheptose-thiobenzhydrazid und Brompropionsäure

Beim Versetzen einer wie auf S. 67 dargestellten, mit Norit entfärbten und auf dem Wasserbad auf 15 g Gewicht eingedunsteten Lösung von *d*-Sedoheptose-thiobenzhydrazid mit 20 ml 1-n. Natronlauge und dann mit 6,2 g mit 40 ml derselben Lauge neutralisierter *d,l*- α -Brompropionsäure entstand ein homogenes Gemisch, welches am folgenden Tag unverändert war und dann von 12 ml 5-n. Salzsäure emulgiert wurde, wonach es bis zum folgenden Tag 3,0 g Hydrazonobenzoyl-thio-milchsäure-anhydrid als flache Prismen vom Schmp. ca. 120°–135° ausschied. Nach dem Umkristallisieren aus 10 ml gew. Alkohol bestand das Produkt aus 2,1 g Kristallen vom Schmp. 136°–138° und ergab bei der Analyse:

Für $C_{10}H_{10}ON_2S$ (206,26):

ber.: C 58,23,	H 4,89,	N 13,58,	S 15,54 %,
gef.: C 58,14,	H 4,93,	N 13,63,	S 15,65 %.

Von dem umkristallisierten Produkt zeigten 0,4577 g in abs. Alkohol auf 20,04 ml gelöst $2 \alpha_D^{20} = +0^\circ,04$, $[\alpha]_D^{20} = +0^\circ,9$,

Das Filtrat des Rohproduktes ergab bei Ausschüttelungen mit 3×100 ml Äther Säuren, entsprechend $24 + 2 + 0,5 = 26,5$ ml 1-n. Natronlauge, und nach Umsatz der so erhaltenen, neutralen Wasserlösung mit 4,2 g Kaliumxanthogenat usw. wurden zum Schluss 2,1 g Dithiodilactylsäuren gewonnen, welche bei ca. 105°–130° schmolzen, das Äquiv.-Gew. 107,4 zeigten, und von denen 0,8152 g in Wasser auf 20,04 ml gelöst $2 \alpha_D^{20} = +0^\circ,04$, $[\alpha]_D^{20} = +0^\circ,5$ ergaben.

Die mit Äther extrahierte Reaktionslösung wurde gegen Lackmus mit 16 ml 1-n. Natronlauge neutralisiert und dann bis zur Abscheidung von Natriumchlorid auf dem Wasserbad eingedunstet. Nach Zusatz von 30 ml Alkohol wurde das in der Wärme ungelöste Salz abfiltriert, wonach das Filtrat beim Erkalten ein wenig einer gummiartigen Masse ausschied. Die hiervon abdekantierte Lösung wurde wie oben eingedunstet, der Rückstand mit Alkohol behandelt und der sirupös gummiartige Eindunstungsrest des alkoholischen Filtrates mit 6 g chlorwasserstoffsäurem Phenylhydrazin und 9 g Natriumazetat in 40 ml Wasser 2 Stunden auf dem Wasserbad erhitzt. Hierbei wurden 3,5 g gelbe Nadeln vom Schmp. 178°–180° (unter Zersetzung) erhalten. Beim Umkristallisieren von 3,35 g dieses Produktes aus 150 ml 63 %-igem Alkohol wurden 2,6 g Bälle aus haarfeinen, gelben Nadeln erhalten, welche wie vorher schmolzen und von denen 0,0962 g in einem Gemisch von 3 Vol. gew. Alkohol mit 2 Vol. Pyridin zu 10,04 ml gelöst nach t Minuten die folgenden Drehungen zeigten:

t :	0	360	1 080	2 520
$0,947 \alpha_D^{20}$:	$-0^\circ,58$	$-0^\circ,50$	$-0^\circ,44$	$-0^\circ,44$

Für $t=0$: $[\alpha]_D^{20} = -63^\circ,9$; für $t=\infty$: $[\alpha]_D^{20} = -48^\circ,5$.

Nach Umkristallisieren in der gleichen Weise schmolz die Substanz bei 181°–183°, was auch noch nach zwei weiteren Umkristallisationen der Fall war. Die Analyse ergab danach:

Für $C_{19}H_{24}O_5N_4$ (388,40):

ber.: C 58,75,	H 6,23,	N 14,43 %,
gef.: C 59,01,	H 6,23,	N 14,59 %.

B. HOLMBERG, Über Thiobenzhydrazide einfacher Zuckerarten

Von dem analysierten Präparat zeigten 0,0966 g in Alkohol-Pyridin wie oben:

t :	0	70	240	600	1 260
$0,947 \alpha_D^{20}$:	$-0^\circ,64$	$-0^\circ,60$	$-0^\circ,52$	$-0^\circ,46$	$-0^\circ,46$

Für $t=0$: $[\alpha]_D^{20} = -70^\circ,2$, für $t=\infty$: $[\alpha]_D^{20} = -50^\circ,5$.

Da der Schmp. dieses Präparates etwas niedriger angegeben wird als derjenige des aus der *d*-Sedoheptose gewinnbaren Osazons und ausserdem die in der Literatur angeführten Angaben über das Drehungsvermögen dieses Osazons stark divergieren (sie bei NORDAL, 16), hat Professor NORDAL einen Vergleich zwischen dem obigen (Präp. H) und einem von ihm selbst mit *d*-Sedoheptose aus *Sedum spectabilis* dargestellten Osazon (Präp. N) angestellt, worüber er dem Verf. Folgendes mitgeteilt hat:

Präp. H: Schmp. 183° – 184° , Präp. N: Schmp. 189° – 190° , Mischschmp. 185° – 186° .

Drehungsbestimmungen an Lösungen in Gemischen aus 3 Teilen 96 %-igem Alkohol und 2 Teilen Pyridin bei $c = 1$ ergaben:

Stunden:	1	3	14	21
$[\alpha]_D^{15}$, Präp. H:	$-61^\circ,3$	$-58^\circ,3$	$-56^\circ,4$	$-50^\circ,4$
$[\alpha]_D^{15}$, Präp. N:	$-64^\circ,4$	$-63^\circ,3$	$-59^\circ,0$	$-49^\circ,6$

Die Drehungen veränderten sich danach nicht mehr, und im grossen ganzen haben sich die beiden Präparate als identisch erwiesen.

V. Formalinprodukte der Zucker-thiobenzhydrazide

1. *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid und Formalin

A. Versuche in alkalischer Lösung

Beim Versetzen einer Lösung von 5,7 g *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid in 20 ml 1-n. Natronlauge mit 3 g Formalin entstand ein homogenes, grünlichgelbes Gemisch, welches allmählich farblos und nach etwa 2 Stunden milchig geworden war, wonach es bis zum folgenden Tag 1,9 g farblose Schuppen vom Schmp. ca. 60° – 80° ausschied. Mit 25 ml warmem, gew. Alkohol ergab das Produkt eine Lösung, welche sich beim Erkalten nicht veränderte, aber bei der freiwilligen Eindunstung Nadeln vom Schmp. ca. 86° – 90° ausschied. Beim Umkristallisieren von 0,8 g dieser Verbindung aus 10 ml gew. Alkohol wurden 0,7 g Nadeln erhalten, welche gemäss dem Schmp. 90° – 91° und der Analyse aus der früher vom Verf. (2) beschrieben, Methyl-bis-methylthiobenzhydrazid (Formel XII, S. 38) genannten Verbindung bestanden.

Für $C_{17}H_{16}N_4S_2$ (340,45):

ber.:	C 59,97,	H 4,74,	N 16,46,	S 18,83 %,
gef.:	C 60,14,	H 4,79,	N 16,43,	S 18,80 %.

Das Filtrat des zuerst erhaltenen Rohproduktes war schwach ölig und schied nach dem Zusatz von 4 ml 5-n. Salzsäure noch 0,65 g Kristallpulver vom Schmp. 88° – 90° und dann 0,1 g vom Schmp. ca. 175° – 195° aus. Das neue Filtrat ergab

mit 3,5 g Thiobenzhydrazid in 20 ml Alkohol ein homogenes Gemisch, welches bis zum folgenden Tag 3 g *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid vom Schmp. 166° – $167^{\circ},5$, mit 50,78 % C und 5,52 % H, ber. 50,69 % C und 5,67 % H, und (in Pyridin) von $[\alpha]_D^{20} = -36^{\circ},0$ ausschied.

Bei einem neuen Versuch wie oben, aber mit 4 g Formalin, wurden 2,6 g einer auf Tonscherben getrockneten Kristallmasse erhalten, welche bei ca. 52° – 58° schmolz, in Pyridin kein Drehungsvermögen zeigte und bei der Analyse die ungefähre Zusammensetzung eines Methylen-oxymethyl-thiobenzhydrazids (Formel XI, S. 38) zeigte:

Für $C_9H_{10}ON_2S$ (194,25):

ber.: C 55,65, H 5,19, N 14,42, S 16,50 %,
gef.: C 55,22, H 5,20, N 13,74, S 15,76 %.

Über diese Verbindung, die sich auch direkt aus dem Thiobenzhydrazid in alkalischer Lösung und Formalin darstellen lässt, und welche besonders in saurer Lösung schnell in das Methylen-bis-methylen-thiobenzhydrazid übergeht, wird später eine ausführlichere Mitteilung erscheinen.

B. Versuche in verdünntem Alkohol

Versuch 1

Beim Schütteln von 2,85 g *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid mit 20 ml Alkohol, 19 ml Wasser und 1,0 g Formalin war nach einer halben Stunde eine schwach trübe Lösung entstanden, welche filtriert wurde und dann nach *t* Minuten die folgenden Drehungen zeigte:

Tabelle 8.

<i>t</i>	α_D^{20}	<i>t</i>	α_D^{20}	<i>t</i>	α_D^{20}
0	$-6^{\circ},73$	80	$-4^{\circ},55$	2 210	$+5^{\circ},36$
5	$-7^{\circ},00$	150	$-0^{\circ},72$	3 200	$+5^{\circ},17$
10	$-7^{\circ},20$	330	$+4^{\circ},33$	4 440	$+5^{\circ},08$
20	$-7^{\circ},33$	670	$+5^{\circ},89$	5 760	$+5^{\circ},07$
40	$-6^{\circ},80$	1 420	$+5^{\circ},60$	7 200	$+5^{\circ},07$

Die Lösung ging bei der freiwilligen Eindunstung in eine sirupöse Masse über, welche im Vakuum über Schwefelsäure 3,1 g eines grüngelblichen Glases lieferte. Nach Pulverisierung und weiterem Trocknen im Vakuum über Phosphorsäureanhydrid schmolz das Produkt bei ca. 65° – 85° und ergab dann bei der Analyse:

Für $C_{13}H_{16}O_4N_2S$ (296,33):

ber.: C 52,68, H 5,44, N 9,45, S 10,82 %,
gef.: C 52,54, H 5,38, N 9,35, S 10,88 %.

Beim Behandeln von 0,5085 g des analysierten Produktes mit abs. Alkohol trat Gelatinierung ein und erst nach einer Stunde war eine opaleszierende Lösung entstanden, welche nach Filtrieren und Zusatz von mehr Alkohol bis auf 10,04 ml $\alpha_D^{20} = +4^{\circ},98$, $[\alpha]_D^{20} = +98^{\circ},3$, zeigte. Nach 5 bzw. 20 Stunden zeigte die Lösung $\alpha_D^{20} = +4^{\circ},92$ und $+4^{\circ},79$. — Von 0,5215 g des Produktes in Pyridin auf 10,04

ml gelöst, wurde eine Lösung erhalten, welche $\alpha_D^{20} = +5^\circ,71$, $[\alpha]_D^{20} = +109^\circ,9$ und $[M]_D^{20} = +325^\circ,7$ zeigte; nach 2 Stunden wurde $\alpha_D^{20} = +5^\circ,54$ und nach 11 und 25 Stunden $\alpha_D^{20} = +5^\circ,40$, $[\alpha]_D^{20} = +104^\circ,0$ und $[M]_D^{20} = +308^\circ,2$, gefunden.

Eine Lösung von 0,3519 g des Produktes in 10 ml Wasser verbrauchte gegen Phenolphthalein 0,40 ml 0,1000-n. Natronlauge, wonach sie bald farblos wurde, um nach Zusatz von noch 0,10 ml der Lauge wenigstens 10 Minuten lang rot zu verbleiben. Mit noch 10,50 ml der Lauge versetzt wurde sie eine Stunde später durch 10,00 ml 0,1000-n. Salzsäure entfärbt, um bald wieder rot zu werden, worauf sie von weiteren 0,10 ml der Säure bleibend entfärbt wurde.

Versuch 2

Beim Schütteln von 2,85 g *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid mit 20 ml Alkohol, 18 ml Wasser und 2,0 g Formalin entstand im Laufe von 15 Minuten eine klare Lösung, welche nach weiteren 10 Minuten polarimetriert wurde und dann nach t Minuten die folgenden Drehungen zeigte:

Tabelle 9.

t	α_D^{20}	t	α_D^{20}	t	α_D^{20}
0	$-6^\circ,27$	80	$-1^\circ,52$	2 160	$+5^\circ,47$
5	$-6^\circ,51$	160	$+2^\circ,06$	2 880	$+5^\circ,35$
10	$-6^\circ,54$	320	$+4^\circ,95$	3 600	$+5^\circ,30$
20	$-6^\circ,27$	660	$+6^\circ,02$	5 040	$+5^\circ,26$
40	$-4^\circ,67$	1 440	$+5^\circ,71$	5 700	$+5^\circ,26$

Wie beim Versuch 1 wurde dann zum Schluss im Vakuum über Phosphorsäureanhydrid ein glasiges Produkt erhalten, welches bei ca. 60° – 85° schmolz und bei der Analyse die folgende Zusammensetzung zeigte:

Für $C_{14}H_{18}O_5N_2S$ (326,36):

ber.: C 51,52, H 5,56, N 8,58, S 9,83 %,
gef.: C 51,44, H 5,44, N 8,61, S 10,04 %.

Von diesem Produkt ergaben 0,5113 g mit abs. Alkohol zu 10,04 ml aufgefüllt eine Lösung, welche 20 Minuten nach dem Zusatz $\alpha_D^{20} = +4^\circ,66$, $[\alpha]_D^{20} = +91^\circ,5$, zeigte. Nach 1, 6 bzw. 18 Stunden wurden dann $\alpha_D^{20} = +4^\circ,63$, $+4^\circ,57$ und $+4^\circ,50$ gefunden. — Eine Lösung von 0,3140 g des Produktes in 10 ml Wasser wurde gegen Phenolphthalein von 0,51 ml 0,1000-n. Natronlauge rot gefärbt, der Umschlag verblasste jedoch schnell und verblieb nach Zusatz von noch 0,10 ml der Lauge wenigstens 2 Minuten sichtbar. Nach Zufügung von weiteren 9,39 ml der Lauge wurde die Lösung eine Stunde später durch 9,07 ml 0,1000-n. Salzsäure entfärbt; die Farbe kehrte jedoch bald wieder, aber nach Zusatz von noch 0,10 ml Säure blieb die Entfärbung bestehend.

Versuch 3

Beim Schütteln eines Gemisches aus 2,85 g *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid mit 20 ml Alkohol, 16 ml Wasser und 4,0 ml Formalin entstand im Laufe von 15 Minuten eine klare Lösung, welche wie bei den obigen Versuchen zum Schluss im Vakuum über Phosphorsäureanhydrid 3,6 g eines aufgeschäumten Glases lieferte. Nach Pulve-

risierung verlor das Produkt im Vakuum wie vorher, jedoch langsam, weiter an Gewicht und erst nach einem Monat war Gewichtskonstanz eingetreten. Das Produkt schmolz dann bei ca. 60° – 80° und ergab bei der Analyse fast genau dieselbe Zusammensetzung wie das beim Versuch 2 erhaltene:

Für $C_{14}H_{18}O_5N_2S$ (326,36):

ber.: C 51,52, H 5,56, N 8,58, S 9,83 %,

gef.: C 50,91, H 5,49, N 8,39, S 9,56 %.

Eine Lösung von 0,5100 g des Produktes in abs. Alkohol zu 10,04 ml zeigte eine Stunde nach dem Zusatz des Alkohols $\alpha_D^{20} = +4^{\circ},52$, $[\alpha]_D^{20} = +89^{\circ},0$, wonach das Drehungsvermögen wie bei den obigen Präparaten langsam abnahm, und bei der alkalimetrischen Titrierung verhielt sich das hier erhaltene Präparat ganz wie das beim Versuch 2 gewonnene. — Als 3,4 g jenes Präparates in 20 ml Wasser auf dem Wasserbad erhitzt wurden, emulgierte sich die Lösung, und ein braunes Öl wurde ausgeschieden, welches nach 4 Stunden und beim Erkalten im Eisschrank teilweise erstarrte. Beim Umkristallisieren aus 10 ml gew. Alkohol lieferte das Produkt 0,3 g Nadeln vom Schmp. des Methylen-bis-methylthiobenzhydrazids, 90° – 91° , und mit 16,55 % N und 18,68 % S, ber. 16,46 % N und 18,83 % S. Die wässrige Lösung wurde noch einige Stunden erhitzt und ergab dabei etwas mehr ölförmige Produkte, worauf das Filtrat davon mit 1,3 g Thiobenzhydrazid in 10 ml Alkohol bis zum folgenden Tag 0,6 g *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid vom Schmp. 167° – 168° und (in Pyridin) $[\alpha]_D^{20} = -37^{\circ},0$ ausschied.

Aus den beschriebenen Versuchen geht hervor, dass das Arabinose-thiobenzhydrazid sich mit dem Formaldehyd in verschiedenen Weisen umsetzen kann und dass gemäss den gemachten Drehungsbestimmungen die dabei entstehenden Lösungen ihre Zusammensetzungen mit der Zeit verändern. Es wurden daher einige Versuche angestellt, um festzustellen, inwieweit man mit Hilfe von *Eisenchlorid* die Gegenwart unverbrauchten Arabinose-thiobenzhydrazids nachweisen könnte. Hierbei wurden zuerst 5,7 g *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid eine halbe Stunde mit 40 ml Alkohol, 38 ml Wasser und 2,0 g Formalin geschüttelt, wonach die Hälfte der entstandenen und durch Filtrieren von einer Spur eines ungelösten Pulvers befreiten Lösung mit 20 ml 1-m. *Eisenchlorid*-Lösung versetzt wurde. Das Gemisch schied dann bis zum folgenden Tag 1,2 g 5-*l*-Arabinotetraoxybutyl-2-phenyl-1,3,4-thiodiazol als farblose Nadeln vom Schmp. 209° – 211° aus und das Filtrat davon ergab bei freiwilliger Eindunstung während 3 Tage 0,9 g farblose, schmale Prismen vom Schmp. 124° – 126° (unter Gasentwicklung), wonach es bei der fortgesetzten Eindunstung klebrige Massen und zum Schluss auch Kristalle von *Eisenchlorür* ausschied. — Die andere Hälfte der obigen Lösung wurde erst nach 5 Tagen mit *Eisenchlorid* wie oben versetzt und ergab dann zuerst 0,6 g Oxydationsprodukt vom Schmp. 208° – 210° und danach bei der freiwilligen Eindunstung der Mutterlauge 1,1 g Prismen vom Schmp. 120° – 125° . — Bei einem dritten Versuch wurde die wie vorher aus 2,85 g *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid usw. bereitete Lösung freiwillig eingedunstet, bis 3,8 g einer gummiartigen Masse entstanden waren. Diese wurde mit 20 ml 1-m. *Eisenchlorid*-Lösung ausgerührt, wobei eine klare Lösung erhalten wurde, welche bis zum folgenden Tag 0,5 g Thiodiazol-Produkt vom Schmp. 207° – 209° und danach bei der freiwilligen Eindunstung 1,0 g Prismen vom Schmp. 125° – 127° lieferte.

Als andererseits eine durch 1/4-stündiges Schütteln von 2,85 g *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid mit 20 ml Alkohol, 18 ml Wasser und 2,0 g Formalin erhaltene Lösung sogleich mit 20 ml 1-m. *Eisenchlorid*-Lösung versetzt wurde, schied sie bis zum

folgenden Tag 0,85 g Nadeln vom Schmp. 211° – 213° aus; aus der Mutterlauge wurden bei ihrer freiwilligen Eindunstung 1,0 g Prismen vom Schmp. 126° – 128° gewonnen. — Bei einem neuen Versuch wurde das Eisenchlorid erst nach 4 Tagen zugesetzt; die Ausbeute an Thiodiazol-Produkt vom Schmp. 211° – 213° war hier 0,35 g, während aus der Mutterlauge wie gewöhnlich 1,2 g Prismen vom Schmp. 127° – 129° erhalten wurden. Die Analyse dieses Produktes ergab Zahlen, welche andeuten, dass es aus dem chlorwasserstoffsäuren Salz eines zweier Wasserstoffatome beraubten Arabinose-methylenthio-benzhydrazids bestand.

Bei Versuchen, dieses chlorwasserstoffsäure Dehydro-*l*-arabinose-methylenthio-benzhydrazid (Formel XIV S. 39) aus Wasser oder Alkohol umzukristallisieren, traten Zersetzungen ein; es wurden daher 3,4 g wie oben erhaltene Produkte eine Stunde lang mit 25 ml Wasser bei gewöhnlicher Temperatur geschüttelt, wonach das Filtrat von 0,4 g eines ungelösten Pulvers vom Schmp. 128° – 130° (unter Aufschäumen) im Vakuum über Schwefelsäure fast zur Trockene eingedunstet wurde, worauf der Rückstand mit 5 ml gew. Alkohol verrieben, abgenutscht und an der Luft getrocknet wurde. Hierbei wurden 2,6 g eines Produktes erhalten, welches bei 127° – 129° (wie oben) schmolz, im Vakuum über Phosphorsäureanhydrid 3,51 % an Gewicht verlor, dann bei 129° – 130° schmolz (Schmelze blasig) und bei der Analyse ergab:

Für $C_{13}H_{15}O_4N_2ClS$ (330,79):

ber.: C 47,20, H 4,57, N 8,47, Cl 10,72, S 9,69 %,
gef.: C 47,48, H 4,64, N 8,51, Cl 10,80, S 9,75 %.

Eine Lösung von 0,4037 g des getrockneten Produktes in Wasser zu 10,00 ml zeigte 25, 325 und 1500 Minuten nach dem Zusatz des Wassers $\alpha_D^{20} = +2^{\circ},84$, $[\alpha]_D^{20} = +70^{\circ},4$ und $[m]_D^{20} = +232^{\circ},9$. — Andererseits ergab eine Lösung von 0,4928 g desselben Produktes in Pyridin zu 10,00 ml gelöst 30 Minuten nach dem Zusatz des Lösungsmittels:

Tabelle 10.

t	α_D^{20}	t	α_D^{20}	t	α_D^{20}
0	$+3^{\circ},72$	1 330	$+6^{\circ},27$	11 410	$+4^{\circ},90$
10	$+3^{\circ},80$	2 050	$+6^{\circ},24$	13 210	$+4^{\circ},68$
30	$+4^{\circ},08$	2 760	$+6^{\circ},15$	16 030	$+4^{\circ},42$
60	$+4^{\circ},44$	4 210	$+5^{\circ},91$	18 830	$+4^{\circ},15$
150	$+5^{\circ},12$	5 720	$+5^{\circ},70$	21 890	$+3^{\circ},82$
300	$+5^{\circ},68$	7 410	$+5^{\circ},42$	35 100	$+3^{\circ},47$
600	$+6^{\circ},08$	9 280	$+5^{\circ},17$		

Die Lösung war dann zu stark gelbbraun gefärbt um weitere Bestimmungen zu erlauben.

Für $t = 0$ erhält man $[\alpha]_D^{20} = +75^{\circ},5$, für $t = 1\,330$: $[\alpha]_D^{20} = +127^{\circ},2$ und für $t = 35\,100$: $[\alpha]_D^{20} = +70^{\circ},4$.

Beim Titrieren einer Lösung von 0,3576 g Sbst. (= 0,3451 g getrocknet) in 10 ml Wasser gegen Phenolphthalein entstand mit 19,90 ml 0,1000-n. Natronlauge nach vorübergehender Emulgierung eine schwach opaleszierende, unscharf rosafarbene Lösung, welche nach dem Zusatz von weiteren 10,70 ml der Lauge am folgenden Tag unscharf durch 8,20 ml 0,1000-n. Salzsäure entfärbt wurde, Äquiv.-Gew. = 154. Darauf ergab sie einen gleitenden Stärke-Umschlag für 8,70 ml 0,1000-n. J-

Lösung, wonach vier Zusätze von je 0,10 ml der J-Lösung nach 1, 2, 4 bezw. 10 Minuten verbraucht worden waren. — Andererseits ergab eine Lösung von 0,3444 g des Salzes in 20 ml 0,5-n. Salzsäure einen bestehenden Umschlag schon mit einem Tropfen der J-Lösung.

Bei Eindunstung einer Lösung von 4,8 g rohen Dehydrosalzes auf dem Wasserbad wurden 1,9 g Kristallwarzen vom Schmp. 203° – 205° abgeschieden. Das Filtrat davon, welches aus 31 ml einer stark von Formaldehyd riechenden Flüssigkeit bestand, wurde weiter wie vorher eingedunstet usw., ohne etwas Definierbares zu ergeben. Die erhaltenen Kristallwarzen wurden aus 150 ml gew. Alkohol umkristallisiert und lieferten dabei 1,2 g 5-*l*-Arabinotetraoxybutyl-2-phenyl-1,3,4-thiodiazol als haarfeine Nadelchen vom Schmp. 211° – 213° (Zersetzung).

Für $C_{12}H_{14}O_4N_2S$ (282,31):

ber.: C 51,03, H 5,00, N 9,93, S 11,36 %,
gef.: C 50,97, H 4,98, N 9,89, S 11,42 %.

Das dem obigen Chlorid entsprechende bromwasserstoffsäure Salz des Dehydro-*l*-arabinose-methylthiobenzhydrazids wurde in folgender Weise dargestellt: Eine aus 5,7 g *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid, 30 ml Alkohol, 28 ml Wasser und 2 g Formalin wie gewöhnlich bereitete Lösung wurde zuerst an der Luft und dann im Vakuum über Schwefelsäure eingedunstet, wobei 6,4 g eines schwach grünlichgelben, weichen Glases erhalten wurden. Dieses wurde in 20 ml Wasser gelöst und mit einer Lösung von 7,2 g Pyridiniumtribromid vom J-Äquiv.-Gew. 180 in 20 ml Alkohol versetzt. Dabei trat bald Trübung ein, und das Gemisch ging bis zum folgenden Tag in einen Brei aus farblosen, dünnen Prismen über, welche nach Absaugen, Waschen mit 5 ml Wasser und Trocknen an der Luft 5 g wogen, bei 140° – 142° unter Aufschäumen schmolzen, im Vakuum über Phosphorsäureanhydrid 3,25 % an Gewicht verloren, danach bei 141° – 143° wie vorher schmolzen und analysiert wurden.

Für $C_{13}H_{15}O_4N_2BrS$ (375,25):

ber.: C 41,61, H 4,03, N 7,47, Br 21,30, S 8,54 %,
gef.: C 41,82, H 4,09, N 7,53, Br 21,10, S 8,59 %.

Eine Lösung von 0,4162 g der getrockneten Probe in Wasser zu 20,04 ml gelöst zeigte unmittelbar, sowie nach 40, 140 und 340 Minuten, $2\alpha_D^{20} = +2^{\circ},55$, $[\alpha]_D^{20} = +61^{\circ},4$ und $[M]_D^{20} = +230^{\circ},4$. — Eine Lösung von 0,5055 g derselben Probe in Pyridin auf 10,00 ml gelöst zeigte 15 und dann noch *t* Minuten nach dem Zusatz des Lösungsmittels:

Tabelle 11.

<i>t</i>	α_D^{20}	<i>t</i>	α_D^{20}	<i>t</i>	α_D^{20}
0	+3°,57	300	+6°,07	3 620	+5°,74
5	+3°,80	560	+6°,18	4 340	+5°,65
10	+3°,98	930	+6°,22	5 060	+5°,54
20	+4°,27	1 450	+6°,07	6 480	+5°,30
40	+4°,70	2 160	+5°,94	7 920	+5°,07
80	+5°,26	2 900	+5°,84	9 370	+4°,92
150	+5°,74				

Eingetretene Braungelbfärbung der Lösung machte dann weitere Bestimmungen unmöglich.

Für $t = 0$: $[\alpha]_D^{20} = +70^\circ,6$, für $t = 150$: $[\alpha]_D^{20} = +123^\circ,5$ und für $t = 9\,370$: $[\alpha]_D^{20} = +97^\circ,3$.

Als zum Schluss eine Lösung von 5,1 g des Dehydrochlorids in 65 ml Wasser mit einer Lösung von 3 g Kaliumbromid in 10 ml Wasser versetzt wurde, ging das zuerst klare Gemisch schnell in einen Brei aus schmalen und flachen Prismen über, welche am folgenden Tag abgesaugt, mit 10 ml Wasser gewaschen und an der Luft getrocknet wurden, wobei 4,4 g eines Produktes erhalten wurden, welches in zugeschmolzenem Röhrchen bei 132° – 134° und im offenen Röhrchen bei 141° – 142° eine blasige Schmelze lieferte. Im Vakuum über Phosphorsäureanhydrid verlor es 3,43 % an Gewicht, wonach es bei 141° – 143° wie vorher schmolz, 21,27, ber. 21,30, % Br enthielt und in Wasser wie oben $[\alpha]_D^{20} = +62^\circ,5$ zeigte.

Als eine Lösung von 5 g des Dehydrochlorids in 50 ml Wasser mit einer Lösung von 4 g Kaliumjodid in 10 ml Wasser versetzt wurde, entstand sofort eine Fällung von dem entsprechenden Jodid, welche aus 5,7 g schmalen und flachen Prismen vom Schmp. 152° – 154° bestand. Das Salz enthielt 29,97, ber. 30,06, % J und eine in gelinder Wärme dargestellte Lösung von 0,4089 g davon in gew. Alkohol, nach dem Erkalten auf 20,04 ml Volumen aufgefüllt, zeigte $2\alpha_D^{20} = +2^\circ,6$, $[\alpha]_D^{20} = +64^\circ$ (während der Messung beginnende Kristallisation).

Dass das gemäss dem Versuch 1 gewonnene Produkt im grossen und ganzen aus einer Monomethylen-Verbindung besteht, bzw. wie eine solche reagieren kann, geht aus den im Kapitel VI unten beschriebenen Umsetzungen dieses Produktes mit Mercaptosäuren hervor; ein Versuch mit *Thioessigsäure* ergab das gleiche Resultat. Hierbei wurden 3,4 g eines wie bei dem genannten Versuch 1 erhaltenen Eindunstungsrückstandes in 10 ml Wasser gelöst und dann mit 1,0 g dieser Säure versetzt, wobei sogleich Emulgierung eintrat und ein Öl ausgeschieden wurde, welches bis zum folgenden Tag in 3,5 g eines undeutlich kristallinischen Pulvers überging. Dieses schmolz bei 146° – 149° , enthielt 16,96, ber. 17,22, % S und zeigte für eine Lösung von 0,2577 g davon in Pyridin auf 10,04 ml gelöst bei 10 Minuten nach dem Zusatz des Lösungsmittels begonnenen Messungen:

Tabelle 12.

t	α_D^{20}	$C_M^{20} \times 10^4$	t	α_D^{20}	$C_M^{20} \times 10^4$
0	$+8^\circ,32$	—	6 180	$+2^\circ,89$	1,93
5	$+8^\circ,32$	—	8 340	$+2^\circ,10$	1,91
420	$+7^\circ,68$	2,04	12 680	$+1^\circ,18$	1,95
1 140	$+6^\circ,68$	2,07	18 440	$+0^\circ,67$	—
2 580	$+5^\circ,20$	1,98	22 760	$+0^\circ,52$	—
3 300	$+4^\circ,62$	1,95	24 350	$+0^\circ,52$	—
4 740	$+3^\circ,67$	1,91	Im Mittel $C_M^{20} = 2,0 \times 10^{-4}$		

Für $t = 0$: $[\alpha]_D^{20} = +324^\circ$ und für $t = \infty$: $[\alpha]_D^{20} = +20^\circ,3$.

Als 2,4 g dieses als 1-Acetylthio-*l*-arabinose-methylthiobenzhydrazid (Formel XIX, S. 40, $R = \text{COCH}_3$) bezeichneten Produktes aus 25 ml gew. Alkohol umkristallisiert wurden, ergaben sie 1,8 g feinkristallinische Bälle vom Schmp. 149° – 155° .

Für $C_{15}H_{20}O_5N_2S_2$ (372,45):

ber.: C 48,37, H 5,41, N 7,52, S 17,22 %.
 gef.: C 48,43, H 5,43, N 7,53, S 17,18 %.

Für 0,2664 g des umkristallisierten Produktes in Pyridin auf 10,04 ml gelöst wurden wie oben die folgenden Drehungen gefunden:

Tabelle 13.

t	α_D^{20}	$C_M^{20} \times 10^4$	t	α_D^{20}	$C_M^{20} \times 10^4$
0	$-6^\circ,18$	—	6 480	$-1^\circ,65$	1,84
10	$-6^\circ,17$	—	7 980	$-1^\circ,17$	1,85
360	$-5^\circ,74$	1,95	10 200	$-0^\circ,65$	1,87
960	$-5^\circ,03$	2,03	18 370	$+0^\circ,18$	—
2090	$-3^\circ,96$	2,00	24 020	$+0^\circ,32$	—
3240	$-3^\circ,19$	1,90	27 030	$+0^\circ,32$	—
5040	$-2^\circ,22$	1,86	Im Mittel $C_M^{20} = 1,9 \times 10^{-4}$		

Für $t=0$: $[\alpha]_D^{20} = -233^\circ$ und für $t=\infty$: $[\alpha]_D^{20} = +12^\circ,1$.

Bei dem Umkristallisieren dürfte also eine Umstellung am Kohlenstoffatom Nr 1 eingetroffen sein, welche jedoch dann in der Pyridinlösung zum grössten Teil zurückgegangen ist. — Beim Schütteln von 3,7 g des rohen Thioessigsäure-Produktes mit 20 ml 1-n. Natronlauge entstand im Laufe von 20 Minuten eine gelbe, alkalische Lösung, welche von 15 ml 2-n. Essigsäure emulgiert wurde und dann eine kleine Menge einer sirupösen Masse ausschied, welche nicht zur Kristallisation gebracht werden konnte; bei der freiwilligen Eindunstung der Mutterlauge wurde ein auch nicht kristallisierbarer, sirupös gummiartiger Rückstand erhalten.

C. Versuche in Wasserlösungen

Beim Schütteln von 5,7 g *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid mit 2 g Formalin in 18 ml Wasser entstand im Laufe von 4 Stunden eine homogene, aber auch nach der Behandlung mit Carboraffin opaleszierende Lösung. Diese ergab mit 20 ml 2-n. Eisenchlorid-Lösung ein homogenes, braunes Gemisch, welches bis zum folgenden Tag 0,8 g 5-*l*-Arabinotetraoxybutyl-2-phenyl-1,3,4-thiodiazol als farblose, nadel-förmige Prismen vom Schmp. 206° – 209° und mit 51,26 % C und 5,07 % H, ber. 51,05 % C und 5,00 % H, ausschied. Nach der freiwilligen Eindunstung des Filtrates bis auf 38 g Gewicht wurden daraus 2,4 g des Dehydrochlorids vom Schmp. 125° – 127° (Schmelze blasig) erhalten, welches im Vakuum über Phosphorsäureanhydrid 3,64 % an Gewicht verlor, dann bei 128° – 130° unter Aufschäumen schmolz, 10,16, ber. 10,72, % Cl enthielt und in Wasser $[\alpha]_D^{20} = +69^\circ,3$ zeigte. — Ganz dieselben Ergebnisse lieferten Versuche, bei denen der Zusatz des Eisenchlorids erst 2 oder 5 Tage nach der Bereitung der Ausgangslösungen erfolgte; mit Ausnahme einer geringeren (0,4 g) Ausbeute an dem ersten Reaktionsprodukt war dies auch der Fall, wenn die Ausgangslösungen mit den doppelten Mengen Formalin dargestellt wurden.

Als eine wie oben aus 5,7 g *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid, 2 g Formalin und 18 g Wasser dargestellte Lösung sofort mit einer Lösung von 6,7 g Pyridiniumtribromid vom J-Äquiv.-Gew. 168 versetzt wurde, schied das Gemisch bis zum folgenden Tag 5,1 g Dehydrobromid vom Schmp. 139° – 141° aus. Dieses Salz verlor wie oben 3,05 %

an Gewicht, wonach es bei 140° – 142° schmolz, 21,15, ber. 21,30, % Br enthielt und in Wasser $[\alpha]_D^{20} = +61^{\circ},4$ zeigte.

D. Versuche in sauren Lösungen

a. Versuche in Salzsäure

Beim Schütteln von 2,85 g *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid mit 1,0 g Formalin in 9 ml 1,1-n. Salzsäure entstand schnell eine klare, grüngelbe Lösung, welche 15 Minuten nach Beginn des Versuches polarimetriert wurde und dann nach t Minuten die folgenden Drehungen zeigte:

t :	0	5	15	35	75	145
$0,5 \alpha_D^{20}$:	$+11^{\circ},17$	$+10^{\circ},87$	$+10^{\circ},24$	$+9^{\circ},08$	$+7^{\circ},12$	$+4^{\circ},82$
t :	345	705	1 560 ¹	2 940	4 400	
$0,5 \alpha_D^{20}$:	$+1^{\circ},72$	$-0^{\circ},38$	$-1^{\circ},35$	$-1^{\circ},75$	$-1^{\circ},85$	

Bei der freiwilligen Eindunstung der Lösung wurden dann 2 g einer Kristallmasse erhalten, welche beim Umkristallisieren aus gew. Alkohol flache Prismen lieferte, die in zugeschmolzenem Röhrchen bei 102° – 104° in eine blasige, opake Schmelze übergingen, während sie in offenem Röhrchen, nach starker Sinterung bei ca. 102° , bei 127° – 129° schmolzen (Präparat A).

Dasselbe Salz wurde erhalten, wenn eine wie beim Versuch 1, S. 97, bereitete Lösung von *l*-Arabinose-methylthiobenzhydrazid eingedunstet und der Rückstand von 3,5 g Gewicht mit 10 ml 1-n. Salzsäure versetzt wurde. Hierbei entstand eine klare Lösung, welche im Vakuum über Schwefelsäure in 3,3 g einer cremefarbenen, strahlig kristallinischen Masse überging. Beim Umkristallisieren aus 10 ml gew. Alkohol wurden hieraus 1,9 g farblose oder sehr schwach cremefarbene Prismen erhalten, welche wie das obige Produkt schmolzen (Präp. B).

Für $C_{13}H_{17}O_4N_2ClS$, H_2O (350,82):

ber.:	C 44,50,	H 5,46,	N 7,99,	Cl 10,11,	S 9,14 %,
gef. (Präp. A):	C 44,86,	H 5,49,	N 8,02,	Cl 10,04,	S 9,17 %,
gef. (Präp. B):	C 44,71,	H 5,42,	N 8,03,	Cl 10,16,	S 9,19 %.

Im Vakuum über Phosphorsäureanhydrid verloren 0,6406 g des Präp:s A 0,0332 g oder 5,18, ber. 5,14, % an Gewicht, wonach sie an der Luft wieder 0,0325 g im Gewicht zunahmen. — Eine so getrocknete Probe schmolz bei 136° – 137° ; 0,4824 g davon zeigten in Pyridin auf 10,04 ml gelöst t Minuten nach dem Zusatz des Lösungsmittels:

Tabelle 14.

t	α_D^{20}	t	α_D^{20}	t	α_D^{20}
10	$+4^{\circ},10$	170	$+0^{\circ},66$	4 330	$+0^{\circ},74$
15	$+3^{\circ},82$	310	$\pm 0^{\circ},00$	5 680	$+0^{\circ},88$
20	$+3^{\circ},56$	650	$-0^{\circ},28$	7 130	$+0^{\circ},96$
30	$+3^{\circ},10$	1 350	$-0^{\circ},04$	8 650	$+1^{\circ},03$
50	$+2^{\circ},52$	2 240	$+0^{\circ},32$	10 100	$+1^{\circ},03$
90	$+1^{\circ},60$	3 150	$+0^{\circ},54$		

Für $t = 0^2$: $[\alpha]_D^{20} = +98^{\circ}$, für $t = 650$: $[\alpha]_D^{20} = -5^{\circ},8$, für $t = \infty$: $[\alpha]_D^{20} = +21^{\circ},4$.

¹ Von nun ab musste die Lösung vor jeder Bestimmung filtriert werden.

² Hier wie in allen derartigen Fällen ist der Null-Wert extrapoliert worden.

Von dem wasserhaltigen Präparat ergaben 0,5325 g in Wasser auf 10,04 ml gelöst sofort und nach 10 und 20 Minuten $\alpha_D^{20} = -1^\circ,58$, $[\alpha]_D^{20} = -29^\circ,8$, woraus für die wasserfrei Probe $[\alpha]_D^{20} = -31^\circ,4$ und $[\eta]_D^{20} = -104^\circ,5$ erhalten wird.

Als eine mit Phenolphthalein versetzte Lösung von 0,3638 g des lufttrockenen Salzes in 10 ml Wasser titriert wurde, trat mit 10,70 ml 0,1000-n. Natronlauge eine schnell verblassende Rotfärbung ein, was dem Äquiv.-Gew. 340, ber. 350,8, entspricht. Neue Zusätze der Lauge wurden auch schnell verbraucht und, als insgesamt 12,25 ml davon hinzugefügt worden waren, wurde die Lösung nach 2 Stunden durch 0,45 ml 0,1000-n. Salzsäure entfärbt.

Bei einer neuen Darstellung des als das Chlorid eines zyklischen *l*-Arabonsäure-methyl-thiobenzoyl-hydrazids (Formel XVII, S. 40) aufgefassten Salzes wurde die aus 5,7 g *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid, 20 ml 1-n. Salzsäure und 2,0 g Formalin wie oben erhaltene Lösung sogleich im Vakuum über Schwefelsäure eingedunstet, wobei 7 g eines kristallinen Rückstands erhalten wurden, welcher beim Umkristallisieren aus 20 ml gew. Alkohol 4 g mit 10 ml desselben Alkohols gewaschene und an der Luft getrocknete, nadelförmige Prismen lieferte. Von diesem Produkt, welches in zugeschmolzenem Röhrchen bei 100° – 102° schmolz und 10,17, ber. 10,11, % Cl enthielt, wurden 3,5 g mit 10 ml Wasser behandelt, wobei eine opaleszierende Lösung entstand. Diese Lösung verbrauchte gegen Phenolphthalein 10,3 ml 1-n. Natronlauge, danach im Laufe von 26 Stunden 10,1 ml und dann während 8 Tage 6 ml davon, wonach die von einer Spur einer abgeschiedenen, klebrigen Masse abfiltrierte Lösung bei der freiwilligen Eindunstung in eine sirupöse Masse überging. Diese Masse gab mit 18 ml 2-n. Salzsäure ein schwach trübes Gemisch, welches bis zum folgenden Tag 0,8 g gelbliche Aggregate von kleinen Prismen ausschied, welche bei ca. 150° sinterten und dann bei ca. 160° – 165° eine blasige Schmelze ergaben. Bei der Umkristallisation aus gew. Alkohol ergab das Produkt schmale, cremefarbene Prismen vom Schmp. 169° – 171° (unter Gasentwicklung) und der Zusammensetzung eines Methyl-thiobenzoyl-hydrazinhydrochlorids:

Für $C_8H_{11}N_2ClS$ (202,71):

ber.: C 47,40,	H 5,47,	N 17,49,	Cl 13,82,	S 15,82 %,
gef.: C 47,47,	H 5,57,	N 17,57,	Cl 13,77,	S 15,90 %.

Beim Titrieren von 0,1200 g des Salzes in 10 ml Wasser gegen Phenolphthalein wurde ein unscharfer Umschlag für 10,90 ml 0,1000-n. Natronlauge erhalten, Äquiv.-Gew. = 110; nach dem Zusatz von weiteren 10,90 ml der Lauge wurde die Lösung am nächsten Tag unscharf von der gleichen Menge 0,1000-n. Salzsäure entfärbt, wonach sie unter Emulgierung momentan 7,6 und danach mit allmählich langsamer Entfärbung noch 3 ml 0,1000-n. J-Lösung verbrauchte.

Nach Behandlung von 7,4 g des obigen *l*-Arabonsäure-methyl-thiobenzoyl-Salzes mit 25 ml konz. Ammoniak verblieben 0,1 g eines Pulvers vom Schmp. ca. 205° – 208° ungelöst; bei der Eindunstung der Lösung im Vakuum über Schwefelsäure schied sie ein klebriges Öl ab, wonach das Gemisch bei der Behandlung mit 20 ml Wasser und 50 ml Äther nur eine Spur eines klebrigen Pulvers ungelöst zurückliess. Die ätherische Schicht wurde mit 15 ml 2-n. Salzsäure ausgeschüttelt, wonach sie bei der freiwilligen Eindunstung 0,6 g eines viskosen Öls ergab. Dieses Öl war fast vollständig in Salzsäure löslich und zusammen mit der vorher erhaltenen, salzsauren Lösung lieferte die hier erhaltene Lösung bei der freiwilligen Eindunstung 1,7 g cremefarbene Kristallwarzen vom Schmp. 162° – 165° (unter Gasentwicklung). Beim Umkristallisieren aus wenig Alkohol wurden hieraus ähnliche Prismen wie bei dem

Versuch mit Natronlauge oben und von demselben Schmp. und der gleichen Elementarzusammensetzung wie dort erhalten. — Als bei einem analogen Versuch das erhaltene Rohprodukt, 1,8 g, mit Soda-Lösung behandelt wurde, entwickelte sich Kohlendioxyd und eine Emulsion entstand, welche ein klebriges Öl ausschied. Dieses wurde mit Äther aufgenommen und die ätherische Lösung mit 10 ml 1-n. Jodwasserstoffsäure ausgeschüttelt, wonach die saure Lösung bei der freiwilligen Eindunstung gelbliche, kurze und flache Prismen oder schmale, dicke Täfelchen vom Schmp. 146° – 148° (unter Braunfärbung und Aufschäumen) und der Zusammensetzung des dem Chlorid oben entsprechenden Methyl-thiobenzoyl-hydrazinhydrojodids ausschied.

Für $C_8H_{11}N_2JS$ (294,17):

ber.:	C 32,66,	H 3,77,	N 9,53,	J 43,15,	S 10,90 %,
gef.:	C 32,87,	H 3,73,	N 9,58,	J 43,20,	S 10,96 %.

Als bei einem neuen Ammoniak-Versuch die ätherische Lösung des zuerst abgetrennten Öls mit 30 ml 1-n. Natronlauge ausgeschüttelt wurde, ergab die Hälfte der entstandenen, alkalischen Lösung mit 10 ml 2-n. Essigsäure eine Emulsion, welche ein in Alkohol leicht lösliches, viskoses Öl ausschied. Die alkoholische Lösung davon verbrauchte schnell ca. 3 g Jod, aber ein definiertes Reaktionsprodukt konnte nicht erfaßt werden. — Die andere Hälfte der Laugenlösung wurde mit einer Lösung von 2,1 g Monobromessigsäure in 15 ml 1-n. Natronlauge versetzt, wonach sie am folgenden Tag mit 2,5 g Essigsäure ein klares Gemisch ergab. Dieses wurde indessen bald milchig und schied bis zum folgenden Tag 1,0 g farblose Prismen ab, welche bei 90° – 91° schmolzen und die Zusammensetzung eines Methyl-phenyl-oxodihydrothiopyridazins (Formel XVI, S. 40) zeigten:

Für $C_{10}H_{10}ON_2S$ (206,26):

ber.:	C 58,23,	H 4,89,	N 13,58,	S 15,54 %,
gef.:	C 58,06,	H 4,94,	N 13,51,	S 15,44 %.

Die bei der Behandlung des ursprünglichen Ammoniak-Produktes mit Wasser und Äther entstandene, wässrige Lösung war gelbbraun und schied bei der freiwilligen Eindunstung bis zum folgenden Tag nur eine Spur einer klebrigen Masse aus. Das Filtrat davon ergab dann im Vakuum über Schwefelsäure bis fast zur Trockene und Trocknen auf Tonscherben 3,3 g einer teigigen Masse, welche in der Wärme mit $3 \times 20 + 10$ ml gew. Alkohol digeriert wurde, wobei 1,0 g weisses Kristallpulver vom Schmp. 152° – 154° (unter Aufschäumen) als ungelöster Rest erhalten wurden. Die Analyse dieses Produktes ergab die ungefähre Zusammensetzung des Ammonium-arabonates:

Für $C_5H_{13}O_6N$ (183,17):

ber.:	C 32,79,	H 7,15,	N 7,65,	Cl —,	S — %,
gef.:	C 32,27,	H 6,99,	N 7,86,	Cl Spuren	S 0,00 %.

Eine Lösung von 0,2308 g des Produktes in Wasser zu 10,00 ml zeigte $\alpha_D^{20} = +0^{\circ},18$, $[\alpha]_D^{20} = +7^{\circ},8$. — Bei einem neuen Versuch wurden 1,3 g eines ähnlichen Produktes erhalten, von welchem 0,5042 g (entsprechend 0,4078 g *l*-Arabonsäurelacton) in 5,00 ml 2-n. Salzsäure und Wasser zu 10,00 ml gelöst 8 Minuten nach dem Zusatz der Säure die folgenden Drehungen zeigte:

t :	0	10	25	60	130	260	530	1440
α_D^{20} :	$-0^\circ,40$	$-0^\circ,65$	$-0^\circ,93$	$-1^\circ,37$	$-1^\circ,82$	$-2^\circ,10$	$-2^\circ,14$	$-2^\circ,14$

Für freie Säure: $[\alpha]_D^{20} = -7^\circ,9 \rightarrow -42^\circ,4$;

» Lacton: $[\alpha]_D^{20} = -9^\circ,8 \rightarrow -52^\circ,5$.

Als andererseits 0,5135 g (entsprechend 0,4153 g Lacton) mit 3,00 ml (ber. 2,81 ml) 1-n. Salzsäure und Wasser auf 10,00 ml gelöst wurden, zeigte die Lösung wie oben:

Tabelle 15.

t	α_D^{20}	t	α_D^{20}	t	α_D^{20}
0	$-0^\circ,31$	90	$-0^\circ,32$	2 880	$-1^\circ,64$
5	$-0^\circ,29$	150	$-0^\circ,38$	4 320	$-1^\circ,88$
10	$-0^\circ,28$	240	$-0^\circ,45$	6 000	$-2^\circ,02$
20	$-0^\circ,26$	400	$-0^\circ,58$	7 920	$-2^\circ,06$
30	$-0^\circ,25$	720	$-0^\circ,81$	12 900	$-2^\circ,11$
50	$-0^\circ,28$	1 440	$-1^\circ,20$	15 920	$-2^\circ,11$

Für freie Säure: $[\alpha]_D^{20} = -7^\circ,3 \rightarrow -45^\circ,3$;

» Lacton: $[\alpha]_D^{20} = -8^\circ,2 \rightarrow -50^\circ,8$.

Diese Drehungszahlen stehen in guter Übereinstimmung mit den von BÖDENER und TOLLENS (17) und von REHORST (18) für die *l*-Arabonsäure gefundenen Werten. Um diese Säure noch sicherer nachzuweisen, wurden von nicht ganz chloridfreiem Ammoniumarabonat 1,5 g mit 0,9 g *o* Phenylendiamin, 1,2 ml konz. Salzsäure, 0,6 ml Phosphorsäure vom sp. Gew. 1,7, 3 ml Wasser und 1,5 ml Alkohol versetzt und das Gemisch langsam auf und danach 2 Stunden bei 135° – 140° erhitzt, wonach nach dem Abkühlen auf 100° die entstandene, schwarze Masse im Wasserbad mit 15 ml Wasser und etwas Carboraffin einige Zeit bei dieser Temperatur gehalten wurde. Danach wurde ein farbloses Filtrat erhalten, welches beim Alkalisieren mit Ammoniak 1,0 g mikroskopische Sphärokristalle vom Schmp. 217° – 219° (unter Braunfärbung und Gasentwicklung) ausschied. Nach Verreiben mit Aceton, Abfiltrieren und Waschen mit Aceton wog das Produkt 0,95 g, schmolz bei 221° – 223° wie oben und ergab beim Umkristallisieren aus 50 ml 50 %-igem Alkohol 0,75 g flache, nadelartige Prismen vom Schmp. 233° – 234° wie oben und der Zusammensetzung:

Für $C_{11}H_{14}O_4N_2$ (238,24):

ber.: C 55,45, H 5,92, N 11,76 %.

gef.: C 55,36, H 5,93, N 11,72 %.

Eine Lösung von 0,2312 g des Präparates in 5 %-iger Citronensäure-Lösung auf 10,00 ml gelöst zeigte $\alpha_D^{20} = +1^\circ,20$, $[\alpha]_D^{20} = +51^\circ,9$, während MOORE und LINK (19) für in der gleichen Weise gewonnenes *l*-Arabinotetraoxybutyl-benzimidazol den Schmp. 235° (Zersetzung) und $[\alpha]_D^{20} = +49^\circ,2$ gefunden haben.

Nach Erhitzungen auf dem Wasserbad während 1 T Stunden einer Lösung aus 3,5 g des *l*-Arabonsäure-methyl-thiobenzoylhydrazid-chlorids und 20 ml Wasser zeigte diese nach Abkühlungen:

ΔT :	0	4	4	6	8	10
$0,5 \alpha_D^{20}$:	$-2^\circ,10$	$-1^\circ,30$	$-0^\circ,66$	$-0^\circ,08$	$+0^\circ,30$	$+0^\circ,32$,

wonach die dann braungelbe Lösung bei der freiwilligen Eindunstung eine teigige Masse lieferte, deren Bearbeitung jedoch noch nicht abgeschlossen ist.

Beim Versetzen einer Lösung von 3,5 g desselben Chlorids (S. 104) in 20 ml Wasser mit 20 ml 1-m. Eisenchlorid-Lösung entstand ein homogenes Gemisch, welches nach zwei Tagen unverändert war und dann mit 3 g Kaliumjodid in 5 ml Wasser eine braune Emulsion lieferte, welche eine dunkelbraune, klebrige Masse ausschied. Nach Zusatz von 1,1 g Natriumbisulfit ging diese Masse bei der mechanischen Bearbeitung in ein Pulver von äusserst kleinen Nadeln über, welches am folgenden Tag abgenutscht, mit 5 ml Wasser gewaschen und auf Tonscherben getrocknet wurde. Das Produkt wog dann 2,7 g, schmolz in zugeschmolzenem Röhrchen bei ca. 82°–98° und ergab beim Umkristallisieren aus Wasser flache Nadeln, welche im Vakuum über Phosphorsäureanhydrid 7,81 % an Gewicht verloren, dann bei 138°–141° schmolzen, 29,98, ber. 29,92, % J enthielten und auch gemäss dem Drehungsvermögen in Pyridin: $[\alpha]_D^{20} = +87^{\circ} \xrightarrow{720 \text{ Min.}} -16^{\circ},7 \rightarrow +6^{\circ},2$ mit dem unten, S. 110, direkt aus dem *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid mit Formalin und Jodwasserstoff erhaltenen Jodid identisch waren. Eine Einwirkung des Eisenchlorids auf das Ausgangsmaterial war somit nicht eingetreten.

Als dann eine aus 5,7 g *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid und 2 g Formalin in 20 ml 1-n. Salzsäure nach Schütteln während 15 Minuten entstandene Lösung sofort mit 20 ml 2-m. Eisenchlorid-Lösung versetzt wurde, schied das homogene, braune Gemisch bis zum folgenden Tag 0,65 g Nadelchen vom Schmp. 204°–207° aus. Das Filtrat ergab bei der freiwilligen Eindunstung im Luftstrom bis zum nächsten Tag 31 g eines Kristallbreis, welcher beim Absaugen und Waschen mit 2 ml Wasser 2,4 g Prismen vom Schmp. 126°–127° (Schmelze blasig) lieferte. Das Produkt verlor im Vakuum über Phosphorsäureanhydrid 3,69 % an Gewicht, schmolz dann bei 127°–129° wie vorher, enthielt 10,71, ber. 10,72, % Cl und zeigte für 0,4039 g in Wasser auf 10,00 ml gelöst $\alpha_D^{20} = +2^{\circ},92$, $[\alpha]_D^{20} = +72^{\circ},3$; es bestand also aus dem oben (S. 100) beschriebenen Chlorid des Dehydro-*l*-arabinose-methylthiobenzhydrazids. Die Mutterlauge wurde mit 0,5 g Natriumbisulfit und dann mit 3 g Kaliumjodid in 10 ml Wasser versetzt, wonach bis zum folgenden Tag 0,9 g eines mit 3 ml Wasser gewaschenen, feinkristallinen, aber nicht einheitlichen, Pulvers erhalten wurden. Das Filtrat davon schied bei freiwilliger Eindunstung während ein paar Tage ein braunes Öl ab, welches nach Entfärben des Gemisches mit etwas Natriumbisulfit mit Äther aufgenommen wurde, wonach dieser bei der freiwilligen Eindunstung 0,4 g einer strahlig kristallinischen Masse vom Schmp. 37°–39°, nach der Umkristallisation aus wenig gew. Alkohol vom Schmp. 40°–41°, zurückliess. Dieses in Salzsäure sowie in Natronlauge unlösliche, gegen Jod indifferente und optisch inaktive Produkt ergab bei der Analyse die Zusammensetzung des schon oben, S. 73 beschriebenen 2-Phenyl-1,3,4-thiodiazols (Formel VIII, S. 36):

Für $C_8H_6N_2S$ (162,21):

ber.: C 59,23,	H 3,73,	N 17,27,	S 19,77 %,
gef.: C 59,08,	H 3,78,	N 17,29,	S 19,61 %.

Bei einem neuen Versuch wie vorher wurde die mit Formalin erhaltene Lösung erst nach 5 Tagen mit dem Eisenchlorid versetzt, wonach sie bis zum folgenden Tag nur einen unbedeutenden Bodenbelag abschied; bei der Eindunstung des Filtrates davon wie oben wurde praktisch nichts ausgeschieden, während es dann mit 2 g Natriumbisulfit und 4 g Jodkalium in 20 ml Wasser 5 g eines feinkristallinen Pulvers ergab. Dieses schmolz in offenem Röhrchen bei ca. 136° (unter Aufschäumen und

nach Sinteren bei ca. 85°), während es in zugeschmolzenem Röhrchen bei ca. 84° – 86° in eine halbflüssige Schmelze übergang, welche bei ca. 100° klar wurde. Im Vakuum über Phosphorsäureanhydrid verlor das Salz 7,54 % an Gewicht, wonach es bei 133° – 135° schmolz (Schmelze blasig), bei der Analyse 1,19 % Asche und 31,36, ber. 29,92, % J ergab und für 0,4110 g in Wasser zu 20,04 ml gelöst 25 und 120 Minuten nach dem Zusatz des Wassers $2\alpha_D^{20} = -1^{\circ},02$, $[\alpha]_D^{20} = -24^{\circ},9$ zeigte und also aus demselben, obgleich unreinen, Jodid wie oben und S. 110 bestand.

Zum Schluss wurden 3,5 g des Chlorids (S. 104) mit 2 g Thioglykolsäure in 10 ml Wasser versetzt, wobei eine klare, am folgenden Tag unveränderte Lösung entstand, welche beim Ausäthern die Thioglykolsäure fast quantitativ zurücklieferte; auch mit Thioessigsäure trat keine Reaktion ein.

b. Versuche in Bromwasserstoffsäure

Beim Schütteln eines Gemisches aus 5,7 g *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid, 20 ml 1-n. Bromwasserstoffsäure und 2,0 g Formalin entstand schnell eine klare Lösung, welche beim Eindunsten im Vakuum über Schwefelsäure 9 g einer gelblichen Kristallmasse ergab. Beim Umkristallisieren aus 20 ml gew. Alkohol lieferte diese Masse 4 g mit 5 ml desselben Alkohols gewaschene und an der Luft getrocknete, farblose, flache Prismen, welche in zugeschmolzenem Röhrchen bei 95° – 97° in eine kleinblasige Schmelze übergingen. Im Vakuum über Phosphorsäureanhydrid verlor das Präparat 4,35, für $2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ber. 4,56, % an Gewicht und schmolz dann bei 86° – 88° zu einer opaken, dickflüssigen Schmelze. Die Analyse des luftgetrockneten Produktes ergab:

Für $\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{O}_5\text{N}_2\text{BrS}$ (395,27):

ber.: C 39,50,	H 4,84,	N 7,09,	Br 20,22,	S 8,11 %,
gef.: C 39,70,	H 4,81,	N 7,12,	Br 20,17,	S 8,15 %.

Eine Lösung von 0,5097 g des getrockneten Produktes in Wasser zu 10,04 ml zeigte sogleich und nach 10 und 400 Minuten $\alpha_D^{20} = -1^{\circ},33$, $[\alpha]_D^{20} = -26^{\circ},2$ und $[\text{M}]_D^{20} = -101^{\circ},5$. — Von demselben Produkt ergaben 0,5026 g in Pyridin auf 10,04 ml gelöst t Minuten nach dem Zusatz des Lösungsmittels:

Tabelle 16.

t	α_D^{20}	t	α_D^{20}	t	α_D^{20}
10	$+3^{\circ},57$	250	$-0^{\circ},16$	5 000	$+0^{\circ},43$
15	$+3^{\circ},32$	440	$-0^{\circ},52$	6 460	$+0^{\circ},57$
20	$+3^{\circ},07$	720	$-0^{\circ},46$	7 900	$+0^{\circ},67$
40	$+2^{\circ},67$	1 480	$-0^{\circ},21$	9 280	$+0^{\circ},74$
60	$+1^{\circ},76$	2 190	$-0^{\circ},07$	10 780	$+0^{\circ},76$
130	$+0^{\circ},60$	3 570	$+0^{\circ},23$	12 200	$+0^{\circ},76$

Für $t = 0$: $[\alpha]_D^{20} = +81^{\circ}$, für $t = 440$: $[\alpha]_D^{20} = -10^{\circ},4$, für $t = \infty$: $[\alpha]_D^{20} = +15^{\circ},2$.

c. Versuche in Jodwasserstoffsäure

Wie gewöhnlich wurde aus 5,7 g *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid, 20 ml 1-n. Jodwasserstoffsäure und 2,0 g Formalin eine homogene Lösung erhalten, welche nach

dem Impfen mit bei einem Vorversuch erhaltenen Kristallen in einen Brei aus kleinen, farblosen Schuppen übergang. Nach Absaugen, Waschen mit 10 ml Wasser und Trocknen an der Luft wogen diese 6,3 g; in zugeschmolzenem Röhrchen schmolzen sie bei ca. 90°–92° nach Sinterung von ca. 85° an und ihr Gehalt an J betrug 27,03, ber. 27,57, %. Beim Umkristallisieren aus gew. Alkohol wurde die Verbindung als nadelförmige Prismen erhalten, welche nach dem Trocknen an der Luft wie oben bei 88°–92° schmolzen, im Vakuum über Phosphorsäureanhydrid 7,75 %, 2 H₂O entsprechend, an Gewicht verloren und dann bei 138°–140° in eine kleinblasige Schmelze übergingen.

Für C₁₃H₂₁O₆N₂JS (460,29):

ber.: C 33,92,	H 4,60,	N 6,09,	J 27,57,	S 6,96,	H ₂ O 7,83 %,
gef.: C 34,17,	H 4,61,	N 6,10,	J 27,59,	S 7,04,	H ₂ O 7,75 %.

Eine Lösung von 0,5142 g der getrockneten Substanz in Pyridin zu 10,04 ml zeigte t Minuten nach dem Zusatz des Lösungsmittels:

Tabelle 17.

t	α_D^{20}	t	α_D^{20}	t	α_D^{20}
10	+3°,97	470	-0°,85	7 470	+0°,07
15	+3°,66	700	-0°,88	8 610	+0°,17
20	+3°,36	1 420	-0°,72	10 050	+0°,23
30	+2°,89	2 120	-0°,58	13 050	+0°,36
70	+1°,52	2 980	-0°,42	15 800	+0°,42
130	+0°,44	4 300	-0°,26	18 700	+0°,42
250	-0°,47	5 730	-0°,06		

Für $t = 0$: $[\alpha]_D^{20} = +89^\circ$, für $t = 700$: $[\alpha]_D^{20} = -17^\circ,2$, für $t = \infty$: $[\alpha]_D^{20} = +8^\circ,2$.

Eine in gelinder Wärme bereitete Lösung von 0,4705 g Trockensubstanz in Wasser auf 10,04 ml zeigte $\alpha_D^{20} = -1^\circ,10$, $[\alpha]_D^{20} = -23^\circ,5$, $[M]_D^{20} = -99^\circ,7$, wonach bald Kristallisation begann.

Dasselbe Jodid wurde erhalten, wenn eine Lösung von 3,5 g des reinen Chlorids (S. 104) in 20 ml Wasser mit 3 g Kaliumjodid in 10 ml Wasser versetzt wurde. Dabei entstand ein klares Gemisch, welches beim Anreiben zu kristallisieren begann und danach bis zum folgenden Tag 3,5 g mit 10 ml Wasser gewaschene und auf Ton-scherben getrocknete, äusserst kleine Nadelchen ausschied. Das Präparat ging in zugeschmolzenem Röhrchen bei ca. 85° in eine halbflüssige Masse und dann bei 93° in eine klare Schmelze über, während es in offenem Röhrchen nach dem ersten Schmelzen wieder erstarrte, um dann bei ca. 140° aufs neue zu schmelzen (Schmelze blasig). Im Vakuum über Phosphorsäureanhydrid verlor es 7,74, ber. 7,83, % an Gewicht, wonach es bei 140°–142° eine blasige Schmelze ergab und 29,95, ber. 29,92, % J enthielt. Eine Lösung von 0,4197 g des getrockneten Produktes in Wasser auf 20,04 ml gelöst zeigte sofort und nach 40 und 450 Minuten $2 \alpha_D^{20} = -1^\circ,04$, $[\alpha]_D^{20} = -24^\circ,8$.

2. *d*-Xylose-thiobenzhydrazid und Formalin

Beim Versetzen einer Lösung von 5,7 g *d*-Xylose-thiobenzhydrazid in 20 ml 1-n. Natronlauge mit 3 g Formalin entstand ein homogenes Gemisch, welches sich all-

mählich emulgierte und bis zum folgenden Tag ein viskoses Öl ausschied. Die davon separierte Lösung wurde von 4 ml 5-n. Salzsäure emulgiert und schied dann 0,15 g nadelförmige Prismen aus; als das Filtrat davon mit 4 ml 1-n. Natronlauge neutralisiert und mit 1,5 g Thiobenzhydrazid in 10 ml derselben Lauge versetzt worden war, schied es am folgenden Tag nach dem Zusatz von 10 ml 2-n. Essigsäure 2,2 g zurückgebildetes *d*-Xylose-thiobenzhydrazid vom Schmp. 110°–112° aus. Beim Umkristallisieren aus 10 ml gew. Alkohol ergab das Produkt 1,2 g Kristallschuppen vom Schmp. 117°–118° und (in Pyridin) von $[\alpha]_D^{20} = -42^\circ,8$.

Beim Schütteln von 2,9 g *d*-Xylose-thiobenzhydrazid mit 20 ml Alkohol, 19 ml Wasser und 1,0 g Formalin entstand in einigen Minuten eine homogene Lösung, welche 15 Minuten nach dem Anfang die folgenden Drehungen zeigte:

<i>t</i> :	0	5	10	20	40	80	150	300	700	1 400
0,5 α_D^{20} :	-1°,28	-1°,66	-1°,98	-2°,51	-3°,04	-2°,82	-1°,62	+0°,32	+1°,59	+1°,56
			<i>t</i> :	2 160	2 840	3 590	4 280			
			0,5 α_D^{20} :	+1°,49	+1°,44	+1°,39	+1°,40			

Bei der freiwilligen Eindunstung ergab die Lösung dann eine sirupös gummiartige Masse, welche im Vakuum über Phosphorsäureanhydrid in 3,1 g eines schwach gelbgrünlichen Glases vom Schmp. ca. 63°–85° überging.

Für $C_{13}H_{16}O_4N_2S$ (296,33):

ber.:	C 52,69,	H 5,44,	N 9,45,	S 10,82 %,
gef.:	C 52,56,	H 5,38,	N 9,46,	S 10,75 %.

Eine Lösung von 0,5736 g der analysierten Substanz in abs. Alkohol auf 10,04 ml gelöst zeigte 30 Minuten nach dem Zusatz des Alkohols:

Tabelle 18.

<i>t</i>	α_D^{20}	$C_M^{20} \times 10^4$	<i>t</i>	α_D^{20}	$C_M^{20} \times 10^4$
0	+2°,07	—	1 400	+0°,42	9,5
30	+1°,96	—	2 850	+0°,02	—
90	+1°,82	13	4 300	-0°,10	—
210	+1°,62	11	5 750	-0°,18	—
570	+1°,08	10	7 200	-0°,18	—

$$[\alpha]_D^{20} = +38^\circ \rightarrow -3^\circ,2 \text{ und } C_M^{20} = 11 \times 10^{-4}.$$

Von derselben Substanz zeigten 0,5004 g in Pyridin auf 10,04 ml gelöst 10 Minuten nach dem Zusatz des Lösungsmittels:

<i>t</i> :	0	120	400	645	1 410
α_D^{20} :	+1°,37	+0°,38	-0°,93	-1°,48	-1°,84
$C_M^{20} \times 10^4$:	—	31	32	34	—

$$[\alpha]_D^{20} = +30^\circ \rightarrow -37^\circ \text{ und } C_M^{20} = 32 \times 10^{-4}.$$

Eine mit Phenolphthalein versetzte Lösung von 0,3558 g der Substanz in 10 ml Wasser wurde von 1,07 ml 0,1000-n. Natronlauge vorübergehend rotgefärbt, wonach

B. HOLMBERG, Über Thiobenzhydrazide einfacher Zuckerarten

noch 0,50 ml derselben Lauge in 60 Minuten verbraucht wurden. Nach Zusatz derselben Menge der Lauge verblieb die Lösung bis zum folgenden Tag rot, wonach sie durch 0,10 ml 0,1000-n. Salzsäure entfärbt wurde, um allmählich wieder rot zu werden.

Nach dem Versetzen von 2,7 g rohen, gummiartigen Methylenproduktes in 10 ml Wasser mit 10 ml 1-m. Eisenchlorid-Lösung entstand ein homogenes, braunes Gemisch, welches bei der freiwilligen Eindunstung in eine sirupös gummiartige Masse überging.

Bei einem Versuch wie oben, aber mit 2,0 g Formalin, wurde ebenfalls ein sirupös gummiartiger Eindunstungsrückstand erhalten. Im Vakuum über Phosphorsäureanhydrid ging dieser in 3,3 g eines gelben Glases über, welches bei ca. 60°–75° schmolz.

Für $C_{14}H_{18}O_5N_2S$ (326,36):

ber.: C 51,52, H 5,56, N 8,58, S 9,83 %,
gef.: C 51,72, H 5,40, N 8,72, S 10,24 %.

Von diesem Produkt ergaben 0,5815 g in abs. Alkohol auf 10,04 ml gelöst und 30 Minuten nach dem Zusatz des Alkohols:

Tabelle 19.

t	α_D^{20}	$C_M^{20} \times 10^4$	t	α_D^{20}	$C_M^{20} \times 10^4$
0	+2°,18	—	1 890	+0°,12	12,8
210	+1°,62	13,5	3 330	+0°,02	—
570	+0°,98	13,3	4 800	–0°,08	—
1 470	+0°,28	12,5	5 760	–0°,08	—

$$[\alpha]_D^{20} = +40^\circ \rightarrow -1^\circ,4 \text{ und } C_M^{20} = 13 \times 10^{-4}.$$

Nach einstündigem Schütteln von 5,7 g *d*-Xylose-thiobenzhydrazid mit 18 ml Wasser und 2,0 g Formalin war eine stark milchige Lösung entstanden, welche nach einer weiteren Stunde klar geworden war und dann die folgenden Drehungen zeigte:

Tabelle 20.

t	$0,5 \alpha_D^{20}$	t	$0,5 \alpha_D^{20}$	t	$0,5 \alpha_D^{20}$
0	–4°,98	80	+0°,16	2 090	+4°,87
5	–4°,48	150	+2°,43	2 750	+4°,82
10	–4°,04	300	+4°,52	3 470	+4°,79
20	–3°,26	600	+5°,28	4 200	+4°,79
40	–1°,85	1 320	+5°,00		

Die Lösung ergab danach bei der freiwilligen Eindunstung eine gummiartige Masse wie oben.

Bei einem gleichen Versuch mit 5,7 g *d*-Xylose-thiobenzhydrazid, 18 ml 1,1-n. Salzsäure und 2,0 g Formalin entstand schnell eine gelbe Lösung, welche 10 Minuten nach dem Beginn die folgenden Drehungen zeigte:

Tabelle 21.

t	$0,5 \alpha_D^{20}$	t	$0,5 \alpha_D^{20}$	t	$0,5 \alpha_D^{20}$
0	+4°,74	90	+2°,25	1 440	-3°,25
5	+4°,67	180	+0°,86	2 160	-3°,78
10	+4°,57	300	-0°,86	2 880	-3°,93
20	+4°,25	720 ¹	-2°,48	3 600	-4°,02
40	+3°,62				

Bei der freiwilligen Eindunstung lieferte die Lösung dann 6,3 g eines sirupösen Gummis, welcher mit 10 ml heissem, abs. Alkohol eine gelbe Lösung ergab. Nach dem Erkalten schied diese Lösung allmählich 2,5 g Aggregate aus farblosen, flachen Prismen aus, welche bei 123°–125° in eine gelbbraune Schmelze übergingen und die Zusammensetzung eines Chlorids des *d*-Xylonsäure-methyl-thiobenzoyl-hydrazids zeigten:

Für $C_{13}H_{17}O_4N_2ClS$ (332,80):

ber.: C 46,91, H 5,15, N 8,42, Cl 10,65, S 9,63 %,
 gef.: C 47,15, H 5,18, N 8,39, Cl 10,75, S 9,59 %.

Eine Lösung von 0,5018 g dieses Präparates in Wasser auf 10,04 ml gelöst zeigte sofort und nach 3 Stunden $\alpha_D^{20} = -2°,33$, $[\alpha]_D^{20} = -46°,6$ und $[M]_D^{20} = -155°,1$. — Eine Lösung von 0,3540 g Sbst. in 10 ml Wasser ergab mit Phenolphthalein einen guten, aber allmählich verblassenden Umschlag für 10,56 ml 0,1000-n. Natronlauge, Äquiv.-Gew. ber. 332,8, gef. 335,2. — Als 0,6 g desselben Produktes in 3 ml Wasser mit 1,8 ml 1-n. Natronlauge versetzt wurden, entstand eine Emulsion, welche ein klebriges, nach ein paar Stunden wieder in Lösung gegangenes Öl ausschied.

3. *d*-Lyxose-thiobenzhydrazid und Formalin

Beim Schütteln von 3,4 g *d*-Lyxose-thiobenzhydrazid mit 20 ml Alkohol, 19 ml Wasser und 1,1 g Formalin entstand im Laufe einer Stunde ein fast homogenes Gemisch, welches sich indessen immer mehr trübte und in einen Brei aus nadel-förmigen Prismen überging. Diese wurden am nächsten Tag abgesaugt, mit 10 ml 50 %-igem Alkohol gewaschen und an der Luft getrocknet, wonach sie 3,35 g wogen, bei 203°–206° schmolzen und bei der Analyse ergaben:

Für $C_{13}H_{16}O_4N_2S$ (296,33):

ber.: C 52,69, H 5,44, N 9,45, S 10,82 %,
 gef.: C 52,58, H 5,40, N 9,41, S 10,80 %.

Von diesem Produkt zeigten 0,5099 g in Pyridin zu 10,04 ml gelöst t Minuten nach dem Zusatz des Pyridins:

t :	15	265	800	1 450
α_D^{20} :	+7°,30	+7°,62	+7°,80	+7°,84
$[\alpha]_D^{20}$:	= +144° → +154°.			

¹ Von nun ab musste die Lösung vor jeder Bestimmung filtriert werden.

Beim Ausfällen mit Wasser aus seiner Lösung in Pyridin ergab das Produkt farblose Nadeln vom Schmp. 206° – 208° , mit 10,68, ber. 10,82, % S und für 0,5062 g in Pyridin zu 10,04 ml gelöst 10° , 150 und 1500 Minuten nach dem Zusatz $\alpha_D^{20} = +7^{\circ},99$, $[\alpha]_D^{20} = +158^{\circ},5$ und $[M]_D^{20} = +469^{\circ},7$.

Als andererseits 2,9 g *d*-Lyxose-thiobenzhydrazid mit 10 ml 1-n. Salzsäure und 1,0 g Formalin geschüttelt wurden, trat keine sichtbare Auflösung ein, aber als nach einer halben Stunde das ungelöste, aus Bällen aus nadelförmigen Prismen bestehende Pulver abgesaugt, mit 10 ml Wasser gewaschen und an der Luft getrocknet worden war, wog es 2,95 g, schmolz bei 203° – 206° und zeigte die gleiche Zusammensetzung wie oben, nämlich:

C 52,66, H 5,45, N 9,44, S 10,78 %,

und in Pyridin wie oben wies es $[\alpha]_D^{20} = +154^{\circ},5$.

4. *d*-Ribose-thiobenzhydrazid und Formalin

Beim Schütteln von 2,85 g *d*-Ribose-thiobenzhydrazid mit 20 ml Alkohol, 19 ml Wasser und 1,0 g Formalin entstand im Laufe von 15 Minuten ein homogenes Gemisch, welches bei der freiwilligen Eindunstung zuerst eine viskose Unterschicht ausbildete und dann in eine sirupös gummiartige Masse überging. Im Vakuum über Phosphorsäureanhydrid wurden hieraus 3,0 g eines schwach gelblichen Glases erhalten, welches bei ca. 50° – 65° schmolz und die gewöhnliche Zusammensetzung zeigte:

Für $C_{13}H_{16}O_4N_2S$ (296,33):

ber.: C 52,69, H 5,44, N 9,45, S 10,82 %,
gef.: C 52,77, H 5,40, N 9,25, S 10,66 %.

Von dem analysierten Produkt zeigten 0,4961 g in Pyridin auf 10,04 ml gelöst sogleich und nach 15, 25, 200 und 500 Minuten $\alpha_D^{20} = -10^{\circ},32$, $[\alpha]_D^{20} = -208^{\circ},9$ und $[M]_D^{20} = -619^{\circ},0$.

5. *l*-Rhamnose-thiobenzhydrazid und Formalin

Beim Versetzen einer Lösung von 6,0 g *l*-Rhamnose-thiobenzhydrazid in 20 ml 1-n. *Natronlauge* mit 3 g Formalin entstand ein homogenes Gemisch, welches bis zum folgenden Tag 4 g eines viskosen Öles ausschied. Die davon separierte, milchige Lösung wurde filtriert und mit 4 ml 5-n. Salzsäure versetzt, wonach sie bis zum nächsten Tag 1,6 g farblose, nadelförmige Prismen vom Schmp. ca. 190° – 195° ausschied. Beim Umkristallisieren aus 20 ml 50 %-igem Alkohol wurden hieraus 1,0 g schmale Prismen erhalten, welche bei 206° – 208° à 209° schmolzen und die Zusammensetzung eines Rhamnose-methylenthio-benzhydrazids zeigten:

Für $C_{14}H_{18}O_4N_2S$ (310,36):

ber.: C 54,18, H 5,85, N 9,03, S 10,33 %,
gef.: C 54,48, H 5,82, N 9,05, S 10,33 %.

Von diesem Produkt zeigten 0,5049 g in Pyridin zu 10,04 ml gelöst sofort und nach 4 Stunden $\alpha_D^{20} = -8^{\circ},18$, $[\alpha]_D^{20} = -162^{\circ},7$.

Das wässrige Filtrat von dem rohen Methylen-Produkt wurde mit 3 g Thiobenzhydrazid in 25 ml Alkohol versetzt, wonach das entstandene, homogene Gemisch

bis zum folgenden Tag 0,4 g nadelförmige Prismen vom Schmp. 162° – 164° und dann bei der freiwilligen Eindunstung der Mutterlauge 2,9 g einer teigigen Kristallmasse lieferte. Diese Masse wurde mit Äther behandelt, wobei 1,2 g eines Pulvers vom Schmp. 160° – 163° ungelöst verblieben; bei der Umkristallisation dieses und des vorigen Produktes aus 50 ml gew. Alkohol wurden 0,8 g *l*-Rhamnose-thiobenzhydrazid als haarfeine Nadeln vom Schmp. 175° – 176° erhalten. Dieses Präparat enthielt 11,48, für das Rhamnose-thiobenzhydrazid ber. 10,75, % S, und 0,5137 g davon zeigten in Pyridin auf 10,04 ml gelöst $\alpha_D^{20} = -0^{\circ},53$, $[\alpha]_D^{20} = -10^{\circ},4$.

Beim Schütteln von 13,4 g *l*-Rhamnose-thiobenzhydrazid mit 80 ml Alkohol, derselben Menge Wasser und 5 g Formalin entstand im Laufe von 15 Minuten eine klare Lösung, welche bald ein Kristallpulver abzuscheiden begann und bis zum folgenden Tag 12,0 g mit 20 ml Wasser gewaschene und an der Luft getrocknete Nadeln vom Schmp. 207° – 209° lieferte. Bei der freiwilligen Eindunstung des Filtrates wurden weitere 2,0 g solcher Kristalle vom Schmp. 207° – 209° erhalten und als die beiden Präparate, welche in Pyridin $[\alpha]_D^{20} = -162^{\circ}$ bzw. -165° zeigten, zusammen aus 30 ml 50 %-igem Alkohol umkristallisiert wurden, ergaben 2,2 g des Gemisches 1,7 g Methylen-Produkt als nadelförmige Prismen vom Schmp. 209° – 211° und der gleichen Zusammensetzung wie oben, nämlich:

C 54,20, H 5,80, N 9,12, S 10,32 %.

Von diesem Präparat zeigten 0,5038 g in Pyridin auf 10,04 ml gelöst $\alpha_D^{20} = -8^{\circ},32$, $[\alpha]_D^{20} = -165^{\circ},8$ und $[\eta]_D^{20} = -514^{\circ},6$. — Eine Lösung von 0,3104 g desselben Produktes in 20 ml 50 %-igem Alkohol ergab mit Phenolphthalein Rotfärbung durch 2 Tropfen 0,1000-n. Natronlauge; nach Zusatz von insgesamt 11,30 ml der Lauge wurde das etwas getrübbte Gemisch nach einer Stunde durch 11,00 ml 0,1000-n. Salzsäure entfärbt. — Nach 3-stündigem Schütteln von 3,1 g des Methylen-Produktes mit 25 ml 0,5-n. Natronlauge wurden 2,95 g mit 10 ml Wasser gewaschenes, ungelöstes Pulver vom Schmp. 207° – 209° zurückgewonnen.

Aus 3,0 g *l*-Rhamnose-thiobenzhydrazid, 20 ml Alkohol, 18 ml Wasser und 2,0 g Formalin wurde wie oben eine Lösung erhalten, welche bei der freiwilligen Eindunstung sogleich zu kristallisieren begann und bis zum folgenden Tag 2,9 g Methylen-Produkt als schmale Prismen vom Schmp. 208° – 210° , mit 54,22 % C und 5,91 % H und für ihre Lösung in Pyridin von $[\alpha]_D^{20} = -165^{\circ},3$ ausschied.

Beim Schütteln von 3,0 g *l*-Rhamnose-thiobenzhydrazid mit 1,0 g Formalin in 20 ml 1-n. Salzsäure war nach einer Stunde ein kompakter Brei aus kleinen, nadel-förmigen Prismen entstanden, welche nach dem Absaugen, Waschen mit 20 ml Wasser und Trocknen an der Luft 3,05 g wogen, bei 208° – 210° schmolzen und in Pyridin $[\alpha]_D^{20} = -163^{\circ}$ zeigten. — Bei einem neuen Versuch wurde die Kristallmasse nach 5 Tagen und gelegentlichem Umschütteln wie vorher behandelt und ergab dann 2,5 g eines sehr feinkristallinen Pulvers vom Schmp. 200° – 204° . Als 2,3 g davon aus 30 ml 50 %-igem Alkohol umkristallisiert wurden, ergaben sie 1,8 g reines Methylen-Produkt als schmale Prismen, welche bei 210° – 212° schmolzen und 10,30, ber. 10,33, % S aber kein Cl enthielten.

6. *d*-Glucose-thiobenzhydrazid und Formalin

Beim Versetzen einer Lösung von 3,15 g *d*-Glucose-thiobenzhydrazid in 10 ml 1-n. Natronlauge mit 2 g Formalin entstand ein klares Gemisch, welches nach zwei Tagen stark opaleszent geworden war und dann mit 10 ml 2-n. Salzsäure eine

Emulsion lieferte. Diese schied bis zum folgenden Tag 0,8 g Nadeln vom Schmp. 87°–89° aus, wonach die Mutterlauge im Laufe von 3 Tagen noch 0,6 g Nadeln vom Schmp. 86°–88° lieferte. Beim Umkristallisieren dieser beiden Produkte aus 20 ml gew. Alkohol wurden 1,0 g farblose Nadeln vom Schmp. des Methylen-bis-methylen-thiobenzhydrazids, 90°–91°, erhalten. — Das Filtrat des letzten Rohproduktes ergab bei der Eindunstung auf dem Wasserbad einen sirupösen Rückstand, welcher in 10 ml Wasser gelöst und mit 1,5 g Thiobenzhydrazid in 10 ml Alkohol versetzt wurde. Bis zum folgenden Tag schied die dabei erhaltene Lösung 1,6 g zurückgebildetes *d*-Glucose-thiobenzhydrazid vom Schmp. 177°–179° aus. Nach der Umkristallisation aus Alkohol zeigte das Produkt den Schmp. 182°,5–183°,5 und (in Pyridin) $[\alpha]_D^{20} = -41^{\circ},5$.

Beim Schütteln von 3,15 g *d*-Glucose-thiobenzhydrazid mit 20 ml Alkohol, 19 ml Wasser und 1,0 g Formalin entstand im Laufe von 1 1/2 Stunden eine Lösung, welche allmählich zu kristallisieren begann und bis zum folgenden Tag¹ in einen Brei aus haarfeinen Nadeln überging. Nach dem Absaugen, Waschen mit 10 ml 50 %-igem Alkohol und Trocknen auf Tonscherben wog das so erhaltene *d*-Glucose-methylthiobenzhydrazid 2,9 g und schmolz bei 183°–185° zu einer gelbbraunen Schmelze.

Für $C_{14}H_{18}O_5N_2S$ (326,36):

ber.: C 51,52,	H 5,56,	N 8,58,	S 9,82 %,
gef.: C 51,64,	H 5,58,	N 8,63,	S 9,86 %.

Eine in gelinder Wärme bereitete Lösung von 0,5032 g der analysierten Substanz in Pyridin zu 10,04 ml zeigte $\alpha_D^{20} = -8^{\circ},11$, $[\alpha]_D^{20} = -161^{\circ},8$.

Beim Erwärmen von 1,5 g des obigen Produktes mit 50 ml gew. Alkohol entstand erst nach Zusatz von 10 ml Wasser eine klare Lösung, welche beim Erkalten 1,25 g feine Nadeln vom Schmp. 188°–189° ausschied. Eine wie oben hergestellte Lösung von 0,2416 g dieses Präparates in Pyridin zeigte $\alpha_D^{20} = -3^{\circ},96$, $[\alpha]_D^{20} = -164^{\circ},6$ und $[M]_D^{20} = -537^{\circ},2$.

Beim Behandeln von 3,6 g *d*-Glucose-methylthiobenzhydrazid mit 12 ml 1-n. Natronlauge waren am folgenden Tag 3,36 g davon (vom Schmp. 187°–188°) ungelöst verblieben.

Bei einem neuen Versuch wie oben, aber mit 2,0 g Formalin, wurden ungefähr wie dort 2,4 g Nadeln erhalten, welche bei 187°–188° schmolzen und 51,48 % C und 5,50 % H enthielten. Als 0,2482 g davon bei gewöhnlicher Temperatur mit Pyridin behandelt wurden, entstand in ca. einer Stunde eine klare Lösung, welche nach Verdünnen auf 10,04 ml sogleich und nach einer Stunde $\alpha_D^{20} = -3^{\circ},91$, $[\alpha]_D^{20} = -158^{\circ},2$ zeigte.

Beim Versetzen einer wie oben aus 3,15 g *d*-Glucose-thiobenzhydrazid, 20 ml Alkohol, 19 ml Wasser und 1,0 g Formalin hergestellten Lösung mit 2 ml 2-n. Salzsäure trat fast unmittelbar Kristallisation ein; das am folgenden Tag abgesaugte Produkt wog 2,7 g, schmolz bei 188°–189°, enthielt 9,82, ber. 9,82, % S und zeigte in Pyridin $[\alpha]_D^{20} = -158^{\circ},0$. — Beim Schütteln von 3,15 g *d*-Glucose-thiobenzhydrazid mit 1,0 g Formalin in 20 ml 0,5-n. Salzsäure entstand nach einigen Minuten eine klare Lösung, welche sich bald trübte und bis zum folgenden Tag 2,8 g nadelförmige Prismen vom Schmp. 180°–182° und (in Pyridin) $[\alpha]_D^{20} = -148^{\circ}$ ausschied. Nach

¹ In einigen Fällen begann die Kristallisation erst nach mehreren Stunden und wurde dann erst nach 2–4 Tagen beendet.

dem Umkristallisieren wie oben schmolz das Produkt bei 186°–188° und zeigte dann in Pyridin $[\alpha]_D^{20} = -159^\circ$.

Beim Verreiben von 3 g *d*-Glucose-methylthiobenzhydrazid mit 20 ml 1-n. Salzsäure entstand ein dünner Brei, welcher nach 2 Tagen beim Absaugen, Waschen mit 10 ml Wasser und 10 ml gew. Alkohol 0,9 g Pulver vom Schmp. ca. 88°–90° lieferte. Nach Umkristallisieren aus gew. Alkohol bestand das Produkt aus farblosen Nadelchen vom Schmp. 89°–90° und der Zusammensetzung des Methylen-bis-methylthiobenzhydrazids:

Für $C_{17}H_{16}N_4S_2$ (340,46):

ber.: C 59,97,	H 4,74,	N 16,46,	S 18,83 %,
gef.: C 60,01,	H 4,76,	N 16,53,	S 18,92 %.

Das schwach milchige Filtrat des Rohproduktes schied eine geringe Menge einer klebrigen Masse aus; das Filtrat davon lieferte mit 1,5 g Thiobenzhydrazid in 5 ml Alkohol ein homogenes Gemisch, das bis zum folgenden Tag 2,1 g *d*-Glucose-thiobenzhydrazid ausschied, welches bei 182°–183° wie gewöhnlich schmolz, in Pyridin $[\alpha]_D^{20} = -38^\circ,7$ zeigte und

ber.: C 49,67,	H 5,77 %;	gef.: C 49,64,	H 5,80 %,
----------------	-----------	----------------	-----------

enthält.

7. *d*-Mannose-thiobenzhydrazid und Formalin

Eine Lösung von 3,15 g *d*-Mannose-thiobenzhydrazid in 10 ml 1-n. *Natronlauge* lieferte mit 2 g Formalin ein homogenes Gemisch, welches bis zum folgenden Tag eine untere Ölschicht ausbildete. Die nach dem zweiten Tag etwas vermehrte, untere Schicht ging dann nach dem Zusatz von 10 ml 2-n. Essigsäure in 1,5 g einer aus kleinen Nadelchen bestehenden Masse aus Methylen-bis-methylthiobenzhydrazid über, welches bei 87°–89° schmolz und bei der Analyse 16,49 % N und 18,37 % S, ber. 16,46 % N und 18,83 % S, ergab. — Das Filtrat wurde auf dem Wasserbad eingedunstet, wobei ein sirupöser Gummi erhalten wurde, welcher nach Lösen in 15 ml Wasser und Zusatz von 1,5 g Thiobenzhydrazid in 15 ml Alkohol 1,9 g zurückgebildetes *d*-Mannose-thiobenzhydrazid vom Schmp. 193°–194° lieferte. Die Analyse dieses Produktes ergab:

Für $C_{13}H_{18}O_5N_2S$ (314,35):

ber.: C 49,67,	H 5,77,	N 8,91,	S 10,20 %,
gef.: C 49,75,	H 5,78,	N 8,84,	S 10,17 %.

Beim Schütteln von 3,2 g *d*-Mannose-thiobenzhydrazid mit 20 ml Alkohol, 19 ml Wasser und 1,0 g Formalin entstand im Laufe von 3 Stunden eine Lösung, welche bei der freiwilligen Eindunstung 3,1 g nadelförmige Prismen vom Schmp. 172°–174° ausschied. Das an der Luft getrocknete Produkt verlor im Vakuum über Phosphorsäureanhydrid 4,63 % an Gewicht, während ein Gehalt von einem Mol H_2O einem Gewichtsverlust von 5,22 % entsprechen würde. Das getrocknete Produkt zeigte die Zusammensetzung eines Mannose-methylthiobenzhydrazids:

Für $C_{14}H_{18}O_5N_2S$ (326,36):

ber.: C 51,52,	H 5,56,	N 8,58,	S 9,82 %,
gef.: C 51,66,	H 5,54,	N 8,54,	S 9,83 %.

Eine Lösung von 0,3084 g der getrockneten Probe in Pyridin auf 10,04 ml zeigte sofort und nach 6 Stunden $0,947 \alpha_D^{20} = +4^\circ,54$, $[\alpha]_D^{20} = +156^\circ,1$.

Beim Umkristallisieren von 3,8 g eines wie oben erhaltenen Produktes aus 20 ml Wasser wurden 3,45 g mit 10 ml Wasser gewaschene, schmale Prismen erhalten, welche bei 173° – 174° schmolzen, im Vakuum wie oben 5,19, ber. 5,22, % an Gewicht verloren und dann 51,73 % C und 5,64 % H enthielten. Von dem getrockneten Präparat zeigten 0,2537 g in Pyridin auf 10,04 ml gelöst $0,947 \alpha_D^{20} = +3^\circ,74$, $[\alpha]_D^{20} = +156^\circ,3$ und $[\eta]_D^{20} = +510^\circ,1$.

Bei einem Versuch wie den vorigen, aber mit 2,0 g Formalin, wurden 3,0 g eines Produktes erhalten, welches bei 171° – 173° schmolz, im Vakuum wie oben 4,14 % an Gewicht verlor und dann dieselbe Elementarzusammensetzung wie dort und in Pyridin $[\alpha]_D^{20} = +154^\circ,3$ zeigte.

Beim Schütteln von 3,15 g *d*-Mannose-thiobenzhydrazid mit 1,0 g Formalin in 20 ml 0,5-n. Salzsäure entstand in 10 Minuten eine Lösung, welche schnell in einen Brei aus Nadeln überging. Nach Absaugen usw. wogen diese 3,1 g, schmolzen bei 171° – 173° und zeigten nach dem Trocknen im Vakuum über Phosphorsäureanhydrid in Pyridin $[\alpha]_D^{20} = +155^\circ,8$.

8. *d*-Galaktose-thiobenzhydrazid und Formalin

Eine Lösung von 3,15 g *d*-Galaktose-thiobenzhydrazid in 10 ml 1-n. *Natronlauge* ergab mit 2 g Formalin ein homogenes Gemisch, welches allmählich emulgiert wurde und bis zum folgenden Tag 0,9 g Methylen-bis-methylenthio-benzhydrazid als Kristallnadeln vom Schmp. ca. 82° – 86° , nach der Umkristallisation aus Alkohol vom Schmp. 89° – 90° , ausschied. Das Filtrat setzte dann bis zum nächsten Tag nur eine unbedeutende Masse eines Kristallpulvers ab und lieferte danach nach Zusatz von 10 ml 2-n. Essigsäure und Emulgierung 0,9 g einer heterogenen Kristallmasse vom Schmp. ca. 138° – 140° (– 150°). Das Filtrat davon wurde auf dem Wasserbad eingedunstet, wobei eine gummiartige Masse erhalten wurde, welche in 10 ml Wasser gelöst und mit 1,5 g Thiobenzhydrazid in 10 ml Alkohol versetzt wurde. Hierbei entstand ein klares Gemisch, welches bis zum folgenden Tag 0,7 g unreines *d*-Galaktose-thiobenzhydrazid als nadelförmige Prismen vom Schmp. 165° – 168° ausschied. Nach Umkristallisation aus gew. Alkohol schmolz das Produkt bei 174° – 176° und zeigte dann (in Pyridin) $[\alpha]_D^{20} = -37^\circ,4$.

Beim Schütteln von 3,15 g *d*-Galaktose-thiobenzhydrazid mit 20 ml Alkohol, 19 ml Wasser und 1,0 g Formalin wurde im Laufe einer halben Stunde eine opaleszierende Lösung erhalten, welche nach einer weiteren halben Stunde klar geworden war und dann die folgenden Drehungen zeigte:

Tabelle 22.

<i>t</i>	$0,5 \alpha_D^{20}$	<i>t</i>	$0,5 \alpha_D^{20}$	<i>t</i>	$0,5 \alpha_D^{20}$
0	$-3^\circ,08$	90	$+0^\circ,50$	1 400	$+2^\circ,72$
5	$-2^\circ,88$	180	$+2^\circ,12$	2 040	$+2^\circ,67$
10	$-2^\circ,68$	340	$+2^\circ,78$	2 790	$+2^\circ,63$
20	$-2^\circ,28$	670	$+2^\circ,97$	4 320	$+2^\circ,62$
45	$-1^\circ,10$				

Bei der freiwilligen Eindunstung ging die Lösung dann in einen Brei aus nadel-förmigen Prismen über, welche nach Absaugen, Waschen mit 5 ml 50 %-igem Alkohol und Trocknen an der Luft 2,8 g wogen, bei 145°–147° schmolzen und in lufttrockener Form die folgende Zusammensetzung zeigten:

Für $C_{14}H_{18}O_5N_2S, H_2O = C_{14}H_{20}O_6N_2S$ (344,38):

ber.: C 48,82, H 5,85, N 8,14, S 9,31, H_2O 5,23 %,
 gef.: C 48,96, H 5,90, N 8,23, S 9,39, H_2O 5,02 %¹.

Von einer getrockneten Probe zeigten 0,3108 g in Pyridin auf 10,04 ml gelöst 10 Minuten nach dem Zusatz $\alpha_D^{20} = +4^{\circ},85$ und nach 400 Minuten $\alpha_D^{20} = +4^{\circ},49$; $[\alpha]_D^{20} = +157^{\circ}$ bzw. $+145^{\circ},0$.

Beim Umkristallisieren von 2,2 g des Produktes aus 30 ml abs. Alkohol wurden 1,55 g mit 5 ml desselben Alkohols gewaschene, glänzende Schuppen oder dünne Täfelchen erhalten, welche bei 149°–150° schmolzen, weder an der Luft oder im Vakuum über Phosphorsäureanhydrid das Gewicht veränderten, und 51,71 % C und 5,55 % H, ber. 51,52 % C und 5,56 % H, enthielten. Hiervon ergaben 0,2520 g in Pyridin wie oben:

<i>t</i> :	0	10	30	60	110	200	420
0,947 α_D^{20} :	$+3^{\circ},80$	$+3^{\circ},77$	$+3^{\circ},71$	$+3^{\circ},64$	$+3^{\circ},60$	$+3^{\circ},57$	$+3^{\circ},57$

$[\alpha]_D^{20} = +161^{\circ} \rightarrow +150^{\circ},2$.

Eine mit Phenolphthalein versetzte Lösung von 0,3803 g der getrockneten Substanz in 20 ml 50 %-igem Alkohol ergab Rotfärbung mit 0,10 ml 0,1000-n. Natronlauge; der Umschlag verschwand jedoch schnell, und nach Zusatz von insgesamt 12,00 ml der Lauge wurde die Lösung 3 Stunden später durch 11,34 ml 0,1000-n. Salzsäure entfärbt.

Nach einstündigem Schütteln von 3,15 g *d*-Galaktose-thiobenzhydrazid mit 20 ml Alkohol, 18 ml Wasser und 2,0 g Formalin war eine klare Lösung entstanden, welche dann die folgenden Drehungen zeigte:

Tabelle 23.

<i>t</i>	0,5 α_D^{20}	<i>t</i>	0,5 α_D^{20}	<i>t</i>	0,5 α_D^{20}
0	$+0^{\circ},30$	50	$+1^{\circ},34$	670	$+2^{\circ},44$
5	$+0^{\circ},44$	100	$+1^{\circ},83$	1 400	$+2^{\circ},35$
10	$+0^{\circ},58$	200	$+2^{\circ},28$	2 085	$+2^{\circ},32$
20	$+0^{\circ},84$	360	$+2^{\circ},47$	2 835	$+2^{\circ},32$

Wie bei dem vorigen Versuch wurden dann hier 2,5 g nadelförmige Prismen erhalten, welche bei 142°–144° schmolzen, im Vakuum über Phosphorsäureanhydrid 4,91 % an Gewicht verloren und dann in Pyridin $[\alpha]_D^{20} = +154^{\circ} \rightarrow +138^{\circ}$ zeigten.

— Beim Umkristallisieren von 2,1 g des Rohproduktes aus 20 ml Wasser wurden 1,5 g schmale Schuppen oder dünne Täfelchen erhalten, welche bei 147°–149° schmolzen, im Vakuum wie oben 5,23, ber. 5,23, % an Gewicht verloren und dann bei der Analyse ergaben:

¹ Gewichtsverlust im Vakuum über Phosphorsäureanhydrid.

Für $C_{14}H_{18}O_5N_2S$ (326,36):

ber.: C 51,52, H 5,56, N 8,58, S 9,82 %,
 gef.: C 51,44, H 5,52, N 8,54, S 9,80 %.

Von der getrockneten Probe zeigten 0,2565 g in Pyridin wie oben:

t:	0	10	30	60	120	240	640
α_D^{20} :	+3°,88	+3°,85	+3°,79	+3°,71	+3°,67	+3°,60	+3°,60
$[\alpha]_D^{20} = +153^\circ \rightarrow +140^\circ,9.$							

Nach 2-stündigem Schütteln von 3,15 g *d*-Galaktose-thiobenzhydrazid mit 1,0 g Formalin in 20 ml 0,5-n. Salzsäure war noch keine Lösung entstanden, aber ein beim Absaugen und Waschen mit 10 ml Wasser erhaltenes, an der Luft getrocknetes, feinkörniges Pulver von 2,6 g Gewicht erwies sich als aus der Methylen-Verbindung bestehend: Schmp. 145°–147°, Gewichtsverlust im Vakuum wie oben 5,17 % und in Pyridin $[\alpha]_D^{20} = +157^\circ \rightarrow +144^\circ,4.$

9. *d*-Fructose-thiobenzhydrazid und Formalin

Nach 4-stündigem Schütteln von 3,2 g *d*-Fructose-thiobenzhydrazid mit 20 ml Alkohol, 19 ml Wasser und 1,0 g Formalin wurden 1,35 g eines Pulvers abgesaugt, welches sich als fast unverändertes Ausgangsmaterial erwies: Schmp. 173°–174°, $[\alpha]_D^{20} = +18^\circ,1$ (in Pyridin) und Zusammensetzung:

Für $C_{13}H_{18}O_5N_2S$ (314,35):

ber.: C 49,67, H 5,77, N 8,91, S 10,20 %,
 gef.: C 49,84, H 5,81, N 8,92, S 10,18 %.

Das Filtrat wurde freiwillig eingedunstet, wobei zum Schluss 6 g eines Kristallbreies erhalten wurden, welcher beim Absaugen und Waschen mit 10 ml Wasser 1,45 g eines Kristallpulvers lieferte, das auch bei 173°–174° schmolz, aber die Zusammensetzung eines Fructose-methylthiobenzhydrazids aufwies:

Für $C_{14}H_{18}O_5N_2S$ (326,36):

ber.: C 51,52, H 5,56, N 8,58, S 9,82 %,
 gef.: C 51,21, H 5,48, N 8,68, S 9,96 %.

Eine Lösung von 0,4992 g der analysierten Substanz in Pyridin auf 10,04 ml zeigte sofort und nach 2 Stunden $\alpha_D^{20} = -5^\circ,00$, $[\alpha]_D^{20} = -100^\circ,6.$

Bei einem Versuch wie oben, aber mit 2,0 g Formalin, wurden 1,0 g unverbrauchtes *d*-Fructose-thiobenzhydrazid vom Schmp. 175°–176° und $[\alpha]_D^{20} = +24^\circ,6$ (in Pyridin) zurückgewonnen; aus dem Filtrat wurden 1,2 g *d*-Fructose-methylthiobenzhydrazid vom Schmp. 172°–173°, mit 51,67 % C und 5,57 % H und (in Pyridin) $[\alpha]_D^{20} = -102^\circ,6$ erhalten.

Als zum Schluss 3,2 g *d*-Fructose-thiobenzhydrazid mit 2,0 g Formalin in 20 ml 0,5-n. Salzsäure 5 Stunden geschüttelt wurden, trat keine merkbare Lösung ein, aber beim Absaugen, Waschen mit 20 ml Wasser und Trocknen auf Tonscherben wurden dann 2,9 g eines Kristallpulvers erhalten, welches aus der entsprechenden Methylenverbindung bestand: Schmp. 168°–170°, C = 51,49 %, H = 5,74 % und $[\alpha]_D^{20} = -97^\circ,1$ (in Pyridin). Beim Erwärmen von 2 g dieses Produktes mit 100 ml gew. Alkohol verblieben 0,25 g davon ungelöst und das Filtrat schied beim Erkalten

1,0 g Methylen-Derivat als farblose, mikroskopische Nadelchen vom Schmp. 173°–174° aus. Das Präparat enthielt:

ber.:	C 51,52,	H 5,56,	N 8,58,	S 9,82 %,
gef.:	C 51,69,	H 5,78,	N 8,43,	S 9,73 %.

Die Lösung von 0,4840 g des unkristallisierten Produktes in Pyridin auf 10,04 ml gelöst zeigte $\alpha_D^{20} = -4^\circ,95$, $[\alpha]_D^{20} = -102^\circ,7$ und $[M]_D^{20} = -335^\circ,2$.

10. *l*-Sorbose-thiobenzhydrazid und Formalin

Beim Schütteln von 3,6 g aus abs. Alkohol unkristallisiertem *l*-Sorbose-thiobenzhydrazid mit 20 ml Alkohol, 19 ml Wasser und 1,0 g Formalin entstand im Laufe einiger Minuten eine klare Lösung, welche bei der freiwilligen Eindunstung einen sirupösen Gummi lieferte. Im Vakuum zuerst über Schwefelsäure und dann über Phosphorsäureanhydrid ging dieser in eine glasige Masse über vom Schmp. ca. 66°–90° und der Zusammensetzung eines Sorbose-methylthiobenzhydrazids:

Für $C_{14}H_{18}O_5N_2S$ (326,36):

ber.:	C 51,52,	H 5,56,	N 8,58,	S 9,82 %,
gef.:	C 51,29,	H 5,51,	N 8,53,	S 9,65 %.

Eine Lösung von 0,5466 g dieses Glases in Pyridin auf 10,04 ml zeigte 15 Minuten nach dem Zusatz des Pyridins:

<i>t</i> :	0	10	30	90	230	470	750
α_D^{20} :	$-6^\circ,02$	$-6^\circ,28$	$-6^\circ,53$	$-6^\circ,90$	$-7^\circ,08$	$-7^\circ,08$	$-7^\circ,08$
$[\alpha]_D^{20} = -111^\circ \rightarrow -130^\circ,0$.							

Umsetzungen des *l*-Sorbose-methylthiobenzhydrazids mit Thioglykolsäure in Wasser oder 0,5-n. Salzsäure ergaben keine kristallisierbaren Produkte.

11. *d*-Sedoheptose-thiobenzhydrazid und Formalin

Aus 3,5 g *d*-Sedoheptose-thiobenzhydrazid in 20 ml Wasser und 1,0 g Formalin wurde ein homogenes Gemisch erhalten, welches bis zum folgenden Tag 0,2 g unreines Methylen-bis-methylthiobenzhydrazid vom Schmp. 82°–85° ausschied. Das Filtrat davon ergab wie oben bei dem Sorbose-thiobenzhydrazid ein Glas vom Schmp. ca. 75°–105° und der annähernden Zusammensetzung eines Heptose-methylthiobenzhydrazids:

Für $C_{15}H_{20}O_6N_2S$ (356,39):

ber.:	C 50,55,	H 5,66,	N 7,86,	S 9,00 %,
gef.:	C 50,62,	H 5,76,	N 7,37,	S 7,89 %.

Eine Lösung von 0,5110 g des Glases in Pyridin auf 10,04 ml zeigte 25 Minuten nach dem Zusatz des Pyridins:

<i>t</i> :	0	10	270	660	1 440
α_D^{20} :	$-4^\circ,16$	$-4^\circ,26$	$-4^\circ,50$	$-4^\circ,66$	$-4^\circ,66$
$[\alpha]_D^{20} = -82^\circ \rightarrow -91^\circ,6$.					

Auch hier gelang es nicht, eine kristallisierte Thioglykolsäure-Verbindung darzustellen.

VI. Umsetzungen von Zucker-methylthiobenzhydraziden mit Mercaptosäuren

1. Arabinose-methylthiobenzhydrazide und Mercaptosäuren

A. *l*-Arabinose-methylthiobenzhydrazid und Thioglykolsäure

Versuche 1—2

Beim Schütteln von 5,7 g *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid mit 35 ml Alkohol, 33 ml Wasser und 2,0 g Formalin entstand im Laufe von 40 Minuten eine klare Lösung, von welcher die Hälfte sogleich mit 2 g Thioglykolsäure versetzt wurde. Dabei entstand ein klares Gemisch, welches bis zum folgenden Tag 0,25 g eines Additionsproduktes des *l*-Arabinose-methylthiobenzhydrazids mit der Thioglykolsäure (Formel XIX, S. 40, $R = CH_2COOH$), als farblose, flache Prismen oder schmale, dünne Täfelchen vom Schmp. 130° – 133° (Präp. 1) ausschied. Das Filtrat davon ergab bei der freiwilligen Eindunstung ein stark klebriges Pulver, aus dem nichts Einheitliches isoliert werden konnte.

Die andere Hälfte der obigen Reaktionslösung wurde erst nach 5 Tagen mit 2 g Thioglykolsäure versetzt, worauf nach etwa 30 Minuten Kristallisation einsetzte und bis zum folgenden Tag 2 g mit 10 ml 50 %-igem Alkohol gewaschene Kristallschuppen vom Schmp. 131° – 132° ausgeschieden wurden. (Präp. 2.) Die Analyse zeigte, dass auch hier eine Methylthiobenzhydrazino-arabinose-thioglykolsäure entstanden war:

Für $C_{15}H_{20}O_6N_2S$ (388,45):

ber.:	C 46,38,	H 5,19,	N 7,21,	S 16,51 %,
für Präp. 1 gef.:	C —	H —	N 7,23,	S 16,54 %,
für Präp. 2 gef.:	C 46,29,	H 5,15,	N 7,25,	S 16,51 %.

Eine Lösung von 0,2186 g des Präp. 2 in Pyridin zu 10,04 ml zeigte 10 Minuten nach dem Zusatz des Pyridins:

Tabelle 24.

t	α_D^{20}	$C_M^{20} \times 10^4$	t	α_D^{20}	$C_M^{20} \times 10^4$
0	+11°,67	—	720	+6°,02	8,4
5	+11°,62	—	1 440	+2°,80	8,7
10	+11°,57	—	2 890	+0°,32	8,5
90	+10°,76	8,5	4 330	-0°,43	—
180	+ 9°,92	8,4	7 240	-0°,74	—
360	+ 8°,42	8,4	8 690	-0°,74	—
500	+ 7°,42	8,4			

$$[\alpha]_D^{20} = +541^\circ \rightarrow -34^\circ,0 \text{ und } C_M^{20} = 8,5 \times 10^{-4}.$$

Versuche 3—5

Bei der freiwilligen Eindunstung der Hälfte einer wie beim Versuch 1 dargestellten Lösung von *l*-Arabinose-methylthiobenzhydrazid wurden 3,4 g eines sirupösen

Gummis erhalten, welcher mit 1,0 g Thioglykolsäure in 10 ml Wasser ausgerührt wurde. Hierbei entstand ein homogenes Gemisch, welches nach 5 Minuten zu kristallisieren begann, und nach einer Stunde wurden 3,4 g eines mit 10 ml Wasser gewaschenen und an der Luft getrockneten Kristallpulvers vom Schmp. 129°–131° und mit 16,29, ber. 16,51, % S erhalten. Von diesem Produkt zeigten 0,1994 g in Pyridin usw. wie oben:

$$[\alpha]_D^{20} = +491^\circ \rightarrow -28^\circ,7 \text{ und } C_M^{20} = 8,5 \times 10^{-4}.$$

Beim Versuch 4 wurde die wie beim Versuch 1 aus 5,7 g *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid usw. erhaltene Lösung auf dem Wasserbad eingedunstet, wobei nach 3 Stunden 7,1 g eines sirupösen Gummis zurückgeblieben waren. Dieses wurde in 20 ml Wasser gelöst und mit 2 g Thioglykolsäure versetzt, wobei ein homogenes Gemisch entstand, welches bald zu kristallisieren begann und bis zum folgenden Tag 7,3 g mit 15 ml Wasser gewaschene Methylthiobenzhydrazino-*l*-arabinose-thioglykolsäure vom Schmp. 130°–132° und mit 16,47, ber. 16,51, % S ausschied. Diese Säure zeigte in Pyridin wie oben:

$$[\alpha]_D^{20} = +517^\circ \rightarrow -31^\circ,4 \text{ und } C_M^{20} = 8,5 \times 10^{-4}.$$

Von dieser Säure ergaben 4,7 g mit 15 ml konz. Ammoniak eine gelbliche Lösung, welche bis zum folgenden Tag 1,6 g nadelförmige Prismen vom Schmp. ca. 135°–140° ausschied. Beim Umkristallisieren aus 10 ml gew. Alkohol wurde hieraus 1 g fast reines *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid vom Schmp. 163°–165° (Zersetzung) und von $[\alpha]_D^{20} = -33^\circ,6$ (in Pyridin) erhalten.

Für $C_{12}H_{16}O_4N_2S$ (284,33):

ber.: C 50,69,	H 5,67,	N 9,86,	S 11,28 %,
gef.: C 50,58,	H 5,63,	N 9,80,	S 11,29 %.

Aus der Mutterlauge etwas Einheitliches zu isolieren gelang nicht.

Bei einem neuen Versuch wie beim Versuch 3, aber mit 2,4 g Thioglykolsäure, wurden 3,1 g Methylthiobenzhydrazino-*l*-arabinose-thioglykolsäure vom Schmp. 130°–132°, mit 16,51, ber. 16,51, % S und in Pyridin wie oben von

$$[\alpha]_D^{20} = +533^\circ \rightarrow -30^\circ,9 \text{ und } C_M^{20} = 8,8 \times 10^{-4}$$

erhalten.

Versuche 6—7

Beim Schütteln von 5,7 g *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid mit 2,0 g Formalin in 20 ml 1-n. Salzsäure entstand in 5 Minuten eine klare Lösung, von welcher die Hälfte sogleich mit 2 g Thioglykolsäure versetzt wurde. Unter schwacher Wärmeentwicklung trat dabei sofort Emulgierung ein, und ein dünner Brei eines feinkristallinen Pulvers entstand. Das am folgenden Tag abgesaugte, mit 10 ml Wasser gewaschene und auf Tonscherben getrocknete Pulver wog 3,0 g, schmolz bei 126°–128°, enthielt 16,68, ber. 16,51, % S und ergab in Pyridin wie oben:

$$[\alpha]_D^{20} = +513^\circ \rightarrow -34^\circ,3 \text{ und } C_M^{20} = 8,1 \times 10^{-4}.$$

Die andere Hälfte der Versuchslösung schied im Laufe von 3 Tagen eine Spur eines Pulvers aus und als das Filtrat davon mit 2 g Thioglykolsäure versetzt wurde, entstand ein homogenes Gemisch, welches bis zum folgenden Tag nur eine Spur eines Pulvers ausschied. Beim Extrahieren mit 3 × 50 ml Äther lieferte das Filtrat

davon 1,9 g eines auf dem Wasserbad vor der Wasserstrahlpumpe getrockneten Extraktes; von diesem wurden dann vor der Ölpumpe und zum Schluss bei 120° Badtemperatur 1,3 g Destillat und 0,5 g Rückstand in der Form eines gelbgrünen Sirups erhalten. — Die extrahierte Lösung lieferte bei der freiwilligen Eindunstung 3,3 g einer teigigen Kristallmasse, welche beim Umkristallisieren aus 10 ml gew. Alkohol 1,4 g mit 5 ml desselben Alkohols gewaschene und an der Luft getrocknete, farblose, flache Prismen ergab. Dieses Salz schmolz wie das S. 104 erhaltene bei 102°–103°, enthielt 10,02, ber. 10,11, % Cl, verlor im Vakuum über Phosphorsäureanhydrid 5,39, ber. 5,14, % an Gewicht und schmolz dann bei 128°–130°.

Versuche 8—10

Als eine wie beim Versuch 3 dargestellte Portion *l*-Arabinose-methylthiobenzhydrazid mit 1,0 g Thioglykolsäure in 5 ml 2-n. Salzsäure ausgerührt wurde, trat sogleich Kristallisation ein, und es entstand ein Brei eines äusserst feinkristallinischen Pulvers. Nach 24 Stunden wurde der Brei mit 10 ml Wasser ausgerührt, das Pulver abgenutscht, mit 15 ml Wasser gewaschen und auf Tonscherben getrocknet, wonach es 3,3 g wog, bei 129°–131° schmolz und 16,53, ber. 16,51, % S enthielt. In Pyridin wie oben zeigte dieses Produkt

$$[\alpha]_D^{20} = +512^\circ \rightarrow -31^\circ,8 \text{ und } C_M^{20} = 8,6 \times 10^{-4}.$$

Bei einem Versuch wie oben, aber mit 2,0 g Thioglykolsäure, wurden nach einer Stunde 3,2 g feinkristallinisches Pulver erhalten, welches bei 128°–129° schmolz, 16,44 % S enthielt und in Pyridin wie gewöhnlich

$$[\alpha]_D^{20} = +518^\circ \rightarrow -29^\circ,2 \text{ und } C_M^{20} = 9,0 \times 10^{-4}$$

ergab.

Bei einem dritten Versuch wie dem vorigen, aber mit 2,4 g Thioglykolsäure, wurden nach 24 Stunden 2,8 g Reaktionsprodukt vom Schmp. 127°–128°, mit 16,59 % S und in Pyridin wie oben:

$$[\alpha]_D^{20} = +470^\circ \rightarrow -28^\circ,5 \text{ und } C_M^{20} = 8,6 \times 10^{-4}.$$

erhalten. — Von diesem Produkt zeigte eine Lösung von 0,2098 g in 50 %-igem Alkohol auf 10,04 ml gelöst 10 Minuten nach dem Zusatz des Lösungsmittels:

Tabelle 25.

<i>t</i>	α_D^{20}	$C_M^{20} \times 10^4$	<i>t</i>	α_D^{20}	$C_M^{20} \times 10^4$
0	+10°,37	—	360	+2°,84	27,9
5	+10°,27	—	720	-0°,15	30,2
10	+10°,18	—	2 160	-1°,34	—
40	+ 9°,62	16,3	4 320	-1°,50	—
90	+ 8°,48	19,3	5 780	-1°,50	—
180	+ 6°,25	23,7			

$$[\alpha]_D^{20} = +506^\circ \rightarrow -71^\circ,8 \text{ und } C_M^{20} = 16 \times 10^{-4} \rightarrow 30 \times 10^{-4}.$$

Von dem beim Versuch 9 erhaltenen Produkt ergaben 0,2320 g in 50 %-igem Alkohol auf 20,04 ml gelöst $[\alpha]_D^{20} = +523^\circ \rightarrow -66^\circ,4$ und $C_M^{20} = 20 \times 10^{-4} \rightarrow 30 \times 10^{-4}$, während Lösungen von je *a* g Sbst., 2,00 ml *b*-n. Salzsäure und 50 %-igem Alkohol auf 20,04 ml ergaben:

a	b	[H ⁺]	[α] _D ²⁰	C _M ²⁰ × 10 ⁴
0,2031	0,01	0,001	+541° ¹ → -66°,0	20 → 43
0,2090	0,1	0,01	+503° ² → -70°,9	170 → 230
0,2333	1	0,1	— → -72°,1	2200

Schliesslich ergaben 0,2254 g Sbst. mit 1,50 ml 1,00-n. Natronlauge (ber. 0,58 ml) und 50 %-igem Alkohol auf 20,04 ml 9 Minuten nach Zusatz des Lösungsmittels [α]_D²⁰ = +487° und als Endwert [α]_D²⁰ = -54° sowie C_M²⁰ × 10⁴ = 41 → 28. — Eine wie diese, aber mit 0,2228 g Sbst. und 5,84, ber. 5,74, ml 0,1000-n. Natronlauge und 50 %-igem Alkohol auf 20,04 ml bereitete Lösung zeigte 9 Minuten nach dem Zusatz der Lauge und des Alkohols:

t:	0	20	160	860	2 180
2 α _D ²⁰ :	+11°,32	+11°,29	+10°,80	+8°,62	+5°,52
[α] _D ²⁰ :	+509°,1	+507°,7	+485°,7	+387°,7	+248°,3

wonach weitere Bestimmungen durch eine graugelbe Verfärbung unmöglich gemacht wurden.

Eine Lösung von 0,3975 g eines Gemisches der oben erhaltenen Produkte in 40 ml 50 %-igem Alkohol ergab mit Phenolphthalein einen unscharfen Umschlag für 10,33 ml 0,1000-n. Natronlauge, Äquiv.-Gew. ber. 388,4, gef. 384,8, wonach sie einen guten Stärke-Umschlag für 10,20 ml 0,1003-n. J-Lösung, Äquiv.-Gew. 388,5, ergab. — 0,4000 g Sbst. in Alkohol wie oben verbrauchten direkt 10,25 ml 0,1003-n. J-Lösung, Äquiv.-Gew. 389,1, und 0,4022 g Sbst. in Alkohol wie oben verbrauchten nach Zusatz von 5 ml 2-n. Salzsäure 10,30 ml derselben J-Lösung, Äquiv.-Gew. 389,3.

Beim Schütteln von 3,9 g desselben Gemisches mit 50 ml Äther, 25 ml Wasser und 1,3 g Jod wurden in etwa 30 Minuten homogene, gelbliche Flüssigkeitsschichten erhalten, von denen die wässrige mit noch 25 ml Äther ausgeschüttelt wurde. Die vereinigten Ätherlösungen ergaben dann bei der freiwilligen Eindunstung 0,9 g einer teigigen Kristallmasse, welche bei der Fällung mit Benzol aus ihrer Lösung in Essigester zuerst klebrige Massen und dann Kristalle von etwas unreiner Dithiodi-glykolsäure vom Schmp. ca. 102°–105° und Äquiv.-Gew. 97, ber. 91,1, lieferte. — Die extrahierte, wässrige Schicht wurde gegen Phenolphthalein mit 12,5 ml 1-n. Natronlauge neutralisiert und lieferte dann bei der freiwilligen Eindunstung eine gummiartige Masse, welche in 10 ml Wasser gelöst und dann mit 2 g Thioglykolsäure versetzt wurde. Hierbei trat bald Trübung ein und am folgenden Tag wurden 3,1 g Methylenthiobenzhydrazino-*l*-arabiose-thioglykolsäure als nadelförmige Prismen vom Schmp. 130°–132° erhalten. Das Produkt enthielt 16,41, ber. 16,51, % S und zeigte in 50 %-igem Alkohol nach 20 Minuten [α]_D²⁰ = +532° und als Endwert [α]_D²⁰ = -70°,3.

Bei einem neuen Versuch wie dem vorigen wurde die bei der Behandlung mit Jod erhaltene, wässrige Schicht sich selbst überlassen, wobei sie bis zum nächsten Tag in einen Brei aus kleinen Nadelchen überging. Diese wurden dann abgesaugt, mit etwas Wasser gewaschen und auf Tonscherben getrocknet, wonach sie 2,3 g wogen und bei der Umkristallisation aus 10 ml Wasser 1,3 g farblose Nadeln lieferten vom Schmp. 85°–95° (in zugeschmolzenem Röhrchen) und der Zusammensetzung des S. 110 beschriebenen Jodids:

¹ 7 Minuten nach Zusatz des Lösungsmittels.

² 6 Minuten nach Zusatz des Lösungsmittels.

Für $C_{13}H_{21}O_6N_2JS$ (460,29):

ber.: C 33,92,	H 4,60,	N 6,09,	J 27,57,	S 6,96 %
gef.: C 34,08,	H 4,64,	N 6,12,	J 27,58,	S 7,03 %

Im Vakuum über Phosphorsäureanhydrid verlor das Salz 7,72, für 2 H_2O ber. 7,83, % an Gewicht, wonach es bei 138° – 140° unter Aufschäumen schmolz und in Pyridin unmittelbar $[\alpha]_D^{20} = +81^{\circ},5$, nach 740 Minuten $[\alpha]_D^{20} = -16^{\circ},9$ und als Endwert $[\alpha]_D^{20} = +1^{\circ},6$ ergab.

Nach 4-stündigem Schütteln von 5 g Methylthiobenzhydrazino-*l*-arabinose-thioglykolsäuren mit 3 g *d,l*-Thiomilchsäure in 20 ml 1-n. Salzsäure wurden 3,1 g eines mit 10 ml Wasser gewaschenen und auf Tonscherben getrockneten Pulvers vom Schmp. ca. 138° – 144° erhalten, während das Filtrat davon beim Extrahieren mit 2×50 ml Äther 3,3 g eines auf dem Wasserbad vor der Wasserstrahlpumpe getrockneten Extraktes lieferte. Vor der Ölpumpe und bei einer Badtemperatur von zum Schluss 120° wurden hieraus 2,4 g Destillat und 0,8 g Rückstand als eine sirupös gummiartige Masse erhalten. Das Destillat zeigte gegen Neutralrot das Äquiv.-Gew. 101,8 und gegen Jod 102,3; nach Neutralisieren mit 1-n. Natronlauge, Zusatz von etwas Eisenchlorid, Entfärben der Lösung an der Luft und Ansäuern mit Salzsäure lieferte die Masse beim Extrahieren mit Äther 1,6 g eines Gemisches von Dithiodiglykolsäure und Dithiodilactylsäuren, dessen Lösung in 15 ml Wasser $\alpha_D^{20} = +6^{\circ},45$, $[\alpha]_D^{20} = \text{ca. } +60^{\circ}$, zeigte. — Das feste Reaktionsprodukt zeigte in Pyridin $[\alpha]_D^{20} = -513^{\circ} \rightarrow -202^{\circ}$ und $C_M^{20} = 9,0 \times 10^{-4}$ (vergl. S. 134); als 2,35 g davon mit 15 ml Wasser, 50 ml Äther und 0,8 g Jod geschüttelt wurden, entstanden in 10 Minuten homogene Flüssigkeitsschichten, von denen die ätherische nach dem Entfärben des Reaktionsgemisches mit etwas Natriumbisulfid 6 ml 1-n. Natronlauge verbrauchte. Nach erneutem Ausschütteln der Wasserschicht mit dem Äther verbrauchte dieser noch 1 ml Lauge; beim Versetzen der so erhaltenen, neutralen Wasserlösung mit 5 ml 2-n. Salzsäure trat Emulgierung ein und bis zum folgenden Tag wurde ein wenig eines viskosen Öles abgeschieden. Das Filtrat davon lieferte beim Extrahieren mit 2×40 ml Äther 0,65 g einer Kristallmasse, welche mit 10 ml heissem Wasser eine schwach milchige Lösung ergab. Beim Erkalten und bis zum folgenden Tag setzte diese einen unbedeutenden, klebrigen Belag ab; das Filtrat davon ergab mit Äther wie vorher 0,5 g eines Dithiodilactylsäure-Gemisches, welches bei ca. 75° – 95° schmolz, das Äquiv.-Gew. 110 aufwies und für 0,3072 g in Wasser auf 10,04 ml gelöst $\alpha_D^{20} = -7^{\circ},68$, $[\alpha]_D^{20} = -251^{\circ}$ zeigte.

B. Arabinose-methylthiobenzhydrazide und optisch aktive Thiomilchsäuren

Versuche 1—2

Aus 3,4 g wie S. 122, Versuch 3, gewonnenem *l*-Arabinose-methylthiobenzhydrazid und 1,1 g (+)-Thiomilchsäure in 10 ml Wasser wurde ein homogenes Gemisch erhalten, welches allmählich in einen Brei eines feinkristallinen Pulvers überging. Nach 4 Stunden wurde dieses Pulver abgesaugt, mit 15 ml Wasser gewaschen und auf Tonscherben getrocknet, wonach die so erhaltene Methylthiobenzhydrazino-*l*-arabinose-(+)-thiomilchsäure 3,0 g wog, bei 127° – 129° schmolz, 15,53, ber. 15,93, % S enthielt und für 0,2437 g in Pyridin auf 10,04 ml gelöst 10 Minuten nach Zusatz des Lösungsmittels die folgenden Drehungen zeigte:

Tabelle 26.

t	$0,947 \alpha_D^{20}$	$C_M^{20} \times 10^4$	t	$0,947 \alpha_D^{20}$	$C_M^{20} \times 10^4$
0	+12°,05	—	1 440	+7°,24	7,7
5	+12°,02	—	2 160	+6°,23	7,6
10	+11°,98	—	2 880	+5°,64	7,7
90	+11°,57	7,7	3 600	+5°,33	7,5
180	+11°,10	7,9	5 040	+4°,96	—
360	+10°,30	7,7	6 480	+4°,85	—
700	+ 9°,05	7,7	7 920	+4°,85	—

$$[\alpha]_D^{20} = +527^\circ \rightarrow +211^\circ,0 \text{ und } C_M^{20} = 7,7 \times 10^{-4}.$$

Aus 2,45 g des Produktes wurden mit 0,8 g Jod usw. wie S. 126 0,4 g (+)-Dithiodilactylsäure vom Schmp. 114°–117°, Äquiv.-Gew. 107,8 und für 0,3112 g in Wasser auf 10,04 ml gelöst $[\alpha]_D^{20} = +416^\circ$ erhalten.

Bei einem Versuch wie oben, aber mit 1,1 g (–)-Thiomilchsäure, wurden 3,4 g einer Methylenthio benzhydrazino-*l*-arabinose-(–)-thiomilchsäure erhalten, welche bei 148°–150° schmolz, 15,65 % S enthielt und in Pyridin wie oben

$$[\alpha]_D^{20} = +230^\circ \rightarrow -264^\circ,8 \text{ und } C_M^{20} = 9,0 \times 10^{-4}$$

zeigte. Die aus 2,7 g dieses Produktes durch Oxydation mit Jod usw. gewonnene Dithiodilactylsäure wog 0,5 g, schmolz bei 112°–115°, zeigte das Äquiv.-Gew. 107,4 und (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = -402^\circ$.

Versuche 3–4

Wie beim Versuch 1, aber mit 2,5 g (+)-Thiomilchsäure in 5 ml 2-n. Salzsäure, wurden 2,1 g einer Methylenthio benzhydrazino-*l*-arabinose-(+)-thiomilchsäure gewonnen, welche bei 129°–132° schmolz, 15,90, ber. 15,93, % S enthielt und in Pyridin wie oben

$$[\alpha]_D^{20} = +590^\circ \rightarrow +283^\circ,3 \text{ und } C_M^{20} = 8,0 \times 10^{-4}$$

ergab. Die aus diesem Produkt mittels Jod dargestellte Dithiodilactylsäure schmolz bei 113°–116°, ergab das Äquiv.-Gew. 109,4 und zeigte (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = +402^\circ$. — Aus dem Filtrat des ursprünglichen Reaktionsproduktes wurden durch Extraktionen mit 2 × 50 ml Äther 2,1 g eines Extraktes erhalten, welcher vor der Ölpumpe und zum Schluss bei 120° im Bad 1,2 g Destillat und 0,8 g Rückstand lieferte. Das Destillat wurde wie S. 126 in Dithiodilactylsäure überführt, wobei 1,1 g eines Produktes gewonnen wurden, welches bei 115°–118° schmolz, das Äquiv.-Gew. 105,9 und (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = +419^\circ$ zeigte.

Bei einem Versuch wie dem vorigen, aber mit 2,5 g (–)-Thiomilchsäure, wurden 3,0 g eines Kristallpulvers erhalten, welches bei 149°–151° schmolz, 15,98 % S enthielt und in Pyridin wie oben

$$[\alpha]_D^{20} = -605^\circ \rightarrow -289^\circ,3 \text{ und } C_M^{20} = 9,2 \times 10^{-4}$$

zeigte. Die hieraus gewonnene Dithiodilactylsäure schmolz bei 110°–115° und zeigte das Äquiv.-Gew. 107,7 sowie (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = -399^\circ$. — Die wie oben regenerierte, unverbrauchte Thiomilchsäure lieferte eine Dithiodilactylsäure vom Schmp. 113°–117°, Äquiv.-Gew. 105,9 und (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = -405^\circ$.

Versuch 5

Aus 3,3 g *d*-Arabinose-methylthiobenzhydrazid und 1,1 g (+)-Thiomilchsäure in 10 ml Wasser wurden nach 4 Stunden 3,3 g mit 15 ml Wasser gewaschene Methylthiobenzhydrazino-*d*-arabinose-(+)-thiomilchsäure vom Schmp. 149°–151°, mit 15,87, ber. 15,93, % S und in Pyridin

$$[\alpha]_D^{20} = -231^\circ \rightarrow +286^\circ,1 \text{ und } C_M^{20} = 8,75 \times 10^{-4}$$

erhalten. Nach 4-stündigem Schütteln von 2,6 g dieses Produktes mit 0,7 g (-)-Thiomilchsäure in 15 ml 1-n. Salzsäure wurden 1,85 g mit 10 ml Wasser gewaschenes Kristallpulver gewonnen, welches bei 147°–150° schmolz, 15,90 % S enthielt und in Pyridin

$$[\alpha]_D^{20} = -235^\circ \rightarrow +269^\circ,4 \text{ und } C_M^{20} = 8,9 \times 10^{-4}$$

zeigte. Die aus diesem Produkt durch Oxydation mit Jod usw. erhaltenen Dithiodilactylsäuren schmolzen bei ca. 100°–110° und zeigten das Äquiv.-Gew. 108,6 sowie (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = +374^\circ$. Die Mutterlauge des Rohproduktes vom Schmp. 147°–150° ergab bei der Ätherextraktion usw. 0,4 g Destillat, und daraus wurden 0,4 g Dithiodilactylsäuren erhalten, welche bei ca. 90°–115° schmolzen, das Äquiv.-Gew. 106,8 und (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = -232^\circ$ zeigten.

Versuch 6

Wie Versuch 5, aber mit 1,1 g (-)-Thiomilchsäure. Ausbeute 3,2 g an einem Produkt vom Schmp. 131°–133°, mit 15,80 % S und (in Pyridin) von

$$[\alpha]_D^{20} = -600^\circ \rightarrow -213^\circ,9 \text{ und } C_M^{20} = 7,5 \times 10^{-4}.$$

Von diesem Produkt wurden 2,6 g 4 Stunden mit 0,7 g (+)-Thiomilchsäure in 15 ml 1-n. Salzsäure geschüttelt, wonach beim Absaugen, Waschen mit 10 ml Wasser und Trocknen auf Tonscherben 2,2 g eines sehr feinkörnigen Pulvers erhalten wurden. Dieses Präparat schmolz bei 141°–144°, enthielt 16,19 % S und zeigte (in Pyridin)

$$[\alpha]_D^{20} = +556^\circ \rightarrow +235^\circ,5 \text{ und } C_M^{20} = 9,1 \times 10^{-4}.$$

Die aus diesem Produkt gewonnenen Dithiodilactylsäuren schmolzen bei ca. 93°–108° und zeigten das Äquiv.-Gew. 108,8 sowie (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = +326^\circ$, während das Filtrat von demselben beim Ausäthern usw. zum Schluss 0,5 g Dithiodilactylsäuren vom Schmp. ca. 95°–120°, Äquiv.-Gew. 106,1 und (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = -151^\circ$ lieferte.

C. *l*-Arabinose-methylthiobenzhydrazid und inaktive Thiomilchsäure

Versuch 1

Bei freiwilliger Eindunstung einer aus 2,85 g *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid, 20 ml Alkohol, 19 ml Wasser und 1,0 g Formalin bereiteten Lösung wurden 3,6 g eines sirupösen Gummis erhalten, welches mit 1,1 g *d,l*-Thiomilchsäure in 10 ml Wasser ausgerührt wurde. Hierbei entstand ein homogenes Gemisch, welches nach einigen Minuten emulgiert wurde und dann schnell in einen Brei aus einem feinkristallinen Pulver überging. Das nach 4 Stunden abgesaugte, mit 10 ml Wasser gewaschene und an der Luft getrocknete Pulver wog 3,7 g, schmolz bei 131°–135° und hatte die Zusammensetzung einer Methylthiobenzhydrazino-arabinose-thiomilchsäure:

Für $C_{16}H_{22}O_6N_2S_2$ (402,47):

ber.: C 47,74, H 5,51, N 6,96, S 15,93 %.

gef.: C 47,85, H 5,49, N 6,91, S 15,89 %.

Eine Lösung von 0,4200 g Sbst. in 10 ml gew. Alkohol ergab einen ziemlich guten Phenolphthalein-Umschlag für 10,42 ml 0,1000-n. Natronlauge und verbrauchte dann 10,52 ml 0,1000-n. Jod-Lösung: Äquiv.-Gew. ber. 402,5, gef. 403,1 bzw. 399,2.

Eine Lösung von 0,2569 g der Substanz in Pyridin auf 10,04 ml gelöst zeigte mit Beginn 10 Minuten nach dem Zusatz des Pyridins und *t* Minuten danach die folgenden Drehungen:

Tabelle 27.

<i>t</i>	$0,947 \alpha_D^{20}$	$C_M^{20} \times 10^4$	<i>t</i>	$0,947 \alpha_D^{20}$	$C_M^{20} \times 10^4$
0	+10°,88	—	680	+5°,55	8,9
5	+10°,82	—	1 400	+2°,74	8,4
10	+10°,76	—	2 840	+0°,22	8,3
80	+10°,00	9,7	5 030	-0°,67	—
160	+ 9°,20	9,6	7 940	-0°,88	—
320	+ 7°,84	9,3	8 660	-0°,88	—

$$[\alpha]_D^{20} = +454^\circ \rightarrow -36^\circ,3 \text{ und } C_M^{20} = 9,7 \times 10^{-4} \rightarrow 8,3 \times 10^{-4}.$$

Beim Schütteln von 3,55 g eines wie oben gewonnenen Produktes mit 20 ml Wasser, 50 ml Äther und 1,2 g Jod löste sich das Pulver in einigen Minuten auf; nach Entfärbung des Gemisches mit ein wenig Natriumbisulfit ergab die ätherische Lösung beim Verarbeiten wie S. 126 ein Gemisch aus stereoisomeren Dithiodilactylsäuren, welches (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = +8^\circ,3$ zeigte. Die wässrige Schicht wurde sogleich mit 2,1 g *d,l*-Thiomilchsäure versetzt, wobei sie sich schnell trübte und nach 25 Stunden 2,3 g mit 10 ml Wasser gewaschene Nadelchen vom Schmp. 146°–148° und mit 16,19, ber. 15,93, % S ergab. Dieses Produkt zeigte (in Pyridin)

$$[\alpha]_D^{20} = -566^\circ \rightarrow -222^\circ \text{ und } C_M^{20} = 10,1 \times 10^{-4} \rightarrow 8,1 \times 10^{-4},$$

und die daraus durch Oxydation mit Jod usw. gewonnenen Dithiodilactylsäuren zeigten (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = -261^\circ$, während die bei der Umsetzung unverbrauchte Thiomilchsäure 1,0 g Dithiodilactylsäuren vom Schmp. ca. 93°–125°, Äquiv.-Gew. 105,6 und (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = +122^\circ,5$ ergab.

Als 1,9 g des obigen Rohproduktes vom Schmp. 131°–135° aus 10 ml gew. Alkohol umkristallisiert wurden, schied die Lösung beim Erkalten 0,8 g mit 5 ml desselben Alkohols gewaschene, fast nadelförmige Prismen vom Schmp. 130°–142°, mit 15,91, ber. 15,93, % S aus. In Pyridin wie gewöhnlich ergab dieses Präparat

$$[\alpha]_D^{20} = +438^\circ,5 \rightarrow -105^\circ,6 \text{ und } C_M^{20} = 10,5 \times 10^{-4}.$$

Nach 4-stündigem Schütteln von 2,7 g eines ähnlichen Rohproduktes mit 15 ml 1-n. Salzsäure war keine sichtbare Veränderung eingetreten, und beim Absaugen, Waschen mit 15 ml Wasser und Trocknen an der Luft wurden 2,0 g ungelöstes Pulver zurückgewonnen, welches bei 130°–134° schmolz, 16,58 % S enthielt und (in Pyridin)

$$[\alpha]_D^{20} = +380^\circ \rightarrow -40^\circ,1 \text{ und } C_M^{20} = 9,0 \times 10^{-4}$$

zeigte. — Bei 4-stündigem Schütteln von 4 g Rohprodukt mit 1,1 g *d,l*-Thiomilchsäure in 20 ml Wasser trat auch keine sichtbare Umsetzung ein, und das am folgenden Tag zurückgewonnene Material wog 3,75 g, schmolz bei 131°–139°, enthielt 15,99 % S und zeigte (in Pyridin)

$$[\alpha]_D^{20} = +451^\circ \rightarrow -43^\circ,1 \text{ und } C_M^{20} = 8,8 \times 10^{-4}.$$

Nach der Oxydation dieses Materiales mit Jod usw. wurde ein Gemisch aus Dithiodilactylsäuren erhalten, welches (in Wasser) nur $[\alpha]_D^{20} = -1^\circ,0$ zeigte, während die beim Schütteln unverbrauchte Thiomilchsäure 0,8 g Dithiodilactylsäuren vom Schmp. ca. 105°–125°, Äquiv.-Gew. 105,9 und (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = +12^\circ,0$ lieferte.

Als zum Schluss 4 g Rohprodukt 4 Stunden mit 1,1 g *d,l*-Thiomilchsäure in 20 ml 1-n. Salzsäure geschüttelt worden waren, wurden 3,3 g eines Pulvers zurückgewonnen, welches bei 140°–143° schmolz, 16,43 % S enthielt und (in Pyridin)

$$[\alpha]_D^{20} = -560^\circ \rightarrow -229^\circ,6 \text{ und } C_M^{20} = 9,3 \times 10^{-4}$$

zeigte. Die hieraus mit Jod erhaltenen Dithiodilactylsäuren zeigten (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = -266^\circ$; die aus der unverbrauchten Thiomilchsäure mittels Eisenchlorid usw. gewonnenen Dithiodilactylsäuren wogen 0,85 g, schmolzen bei ca. 95°–113° und zeigten das Äquiv.-Gew. 105,7 sowie (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = +199^\circ$.

Versuche 2–5

Beim Eindunsten einer wie beim Versuch 1 dargestellten Lösung von *l*-Arabinose-methylthiobenzhydrazid auf dem Wasserbad entstand ein sirupöses Gummi von 3,5 g Gewicht, welches beim Ausrühren mit 1,05 g *d,l*-Thiomilchsäure ein homogenes Gemisch ergab. Dieses trübte sich nach einigen Minuten und ging dann schnell in einen Brei aus feinkristallinem Pulver über, welches nach einer halben Stunde abgesaugt, mit 10 ml Wasser gewaschen und an der Luft getrocknet wurde, wonach es 3,7 g wog, bei ca. 130°–139° schmolz, 15,90, ber. 15,93, % S enthielt und (in Pyridin)

$$[\alpha]_D^{20} = +412^\circ \rightarrow -37^\circ,6 \text{ und } C_M^{20} = 8,2 \times 10^{-4}$$

zeigte. Als 3,2 g davon mit 1,0 g Jod usw. behandelt wurden, ergab das Pulver zum Schluss 0,7 g Dithiodilactylsäuren vom Schmp. ca. 105°–130°, Äquiv.-Gew. 108,2 und (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = -2^\circ,0$.

Bei einem neuen Versuch wie oben wurde das Reaktionsprodukt erst nach 24 Stunden abgesaugt usw., wonach es 3,6 g wog, bei 128°–137° schmolz, 15,90 % S enthielt und (in Pyridin)

$$[\alpha]_D^{20} = +395^\circ \rightarrow -41^\circ,1 \text{ und } C_M^{20} = 8,5 \times 10^{-4}$$

zeigte. — Die hieraus mittels Jod usw. gewonnenen Dithiodilactylsäuren schmolzen bei ca. 102°–130° und zeigten das Äquiv.-Gew. 107,9 sowie (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = -8^\circ,0$.

Bei den Versuchen 4 und 5 wurden die wie oben erhaltenen *l*-Arabinose-methylthiobenzhydrazide in je 10 ml Wasser gelöst und dann mit 2,4 g *d,l*-Thiomilchsäure versetzt. Beim Versuch 4 wurden dann nach 1/2 Stunde 4,1 g eines Additionsproduktes erhalten, welches bei 127°–137° schmolz, 15,98, ber. 15,93, % S enthielt und (in Pyridin)

$$[\alpha]_D^{20} = +433^\circ \rightarrow -41^\circ,5 \text{ und } C_M^{20} = 8,3 \times 10^{-4}$$

zeigte. Die hieraus mit Jod usw. gewonnenen Dithiodilactylsäuren schmolzen bei ca. 100° – 128° und zeigten das Äquiv.-Gew. 108,2 sowie (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = -3^{\circ},8$. — Die Mutterlauge des Rohproduktes ergab bei der Extraktion mit Äther usw. zum Schluss 0,75 g Dithiodilactylsäuren vom Schmp. ca. 105° – 126° , Äquiv.-Gew. 105,8 und (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = +9^{\circ},9$.

Bei dem Versuch 5 wurde das entstandene Reaktionsprodukt erst nach 24 Stunden abgesaugt usw., wonach es 4,0 g wog, bei 129° – 139° schmolz, 15,95 % S enthielt und (in Pyridin)

$$[\alpha]_D^{20} = +392^{\circ} \rightarrow -52^{\circ},3 \text{ und } C_M^{20} = 8,4 \times 10^{-4}$$

zeigte. Die aus diesem Produkt gewonnenen Dithiodilactylsäuren schmolzen bei ca. 102° – 128° und zeigten das Äquiv.-Gew. 107,9 sowie (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = -19^{\circ},9$, während die bei der ursprünglichen Umsetzung unverbrauchte Thiomilchsäure 0,8 g Dithiodilactylsäuren ergab, welche bei ca. 105° – 125° schmolzen und das Äquiv.-Gew. 105,6 sowie (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = +25^{\circ},7$ zeigten.

Versuche 6—7

Aus 3,5 g eines wie oben dargestellten *l*-Arabinose-methylthiobenzhydrazids in 10 ml Wasser und 2,4 g *d,l*-Thiomilchsäure in der gleichen Menge Wasser wurden nach 10 Stunden 3,8 g mit 20 ml Wasser gewaschene Methylthiobenzhydrazino-*l*-arabinose-thiomilchsäure erhalten, welche bei 134° – 138° schmolz, 15,91, ber. 15,93, % S enthielt und (in Pyridin)

$$[\alpha]_D^{20} = +463^{\circ} \rightarrow -28^{\circ},7 \text{ und } C_M^{20} = 8,7 \times 10^{-4}$$

zeigte. Die hieraus gewonnenen Dithiodilactylsäuren schmolzen bei ca. 103° – 126° und zeigten das Äquiv.-Gew. 108,2 sowie (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = +9^{\circ},3$, während aus der bei der ursprünglichen Umsetzung unverbrauchten Thiomilchsäure 0,9 g Dithiodilactylsäuren vom Schmp. ca. 103° – 126° , Äquiv.-Gew. 106,8 und (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = -3^{\circ},2$ erhalten wurden.

Bei einem neuen Versuch wurde das wie oben erhaltene Reaktionsgemisch 10 Stunden geschüttelt, wonach es 3,6 g eines Pulvers vom Schmp. 134° – 138° , mit 15,99 % S und (in Pyridin) von

$$[\alpha]_D^{20} = +446^{\circ} \rightarrow -42^{\circ},0 \text{ und } C_M^{20} = 8,4 \times 10^{-4}$$

lieferte. Die hieraus gewonnenen Dithiodilactylsäuren schmolzen bei ca. 103° – 125° und zeigten das Äquiv.-Gew. 107,1 sowie (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = -10^{\circ},5$, während aus der bei der ursprünglichen Umsetzung unverbrauchten Thiomilchsäure 0,9 g Dithiodilactylsäuren vom Schmp. ca. 105° – 128° , Äquiv.-Gew. 106,1 und (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = +12^{\circ},0$ gewonnen wurden.

Versuche 8—11

Beim Versetzen einer Lösung von 3,5 g eines wie beim Versuch 2 dargestellten *l*-Arabinose-methylthiobenzhydrazids in 8 ml Wasser mit 1,05 g *d,l*-Thiomilchsäure in 2,00 ml 5-n. Salzsäure trat unmittelbar Emulgierung ein und ein Öl wurde ausgeschieden, welches beim Anreiben in einen Brei aus feinkristallinem Pulver überging. Das nach einer halben Stunde abgesaugte, mit 10 ml Wasser gewaschene und auf Tonscherben getrocknete Pulver wog 3,4 g, schmolz bei ca. 129° – 139° , enthielt 15,83, ber. 15,93, % S und ergab (in Pyridin)

$$[\alpha]_D^{20} = +369^{\circ} \rightarrow -31^{\circ},4 \text{ und } C_M^{20} = 8,8 \times 10^{-4}$$

Aus 2,8 g dieses Produktes wurden mittels 0,9 g Jod usw. 0,7 g Dithiodilactylsäuren gewonnen, welche bei ca. 100°–128° schmolzen und das Äquiv.-Gew. 108,5 sowie (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = -16^\circ,6$ zeigten.

Bei dem nächsten Versuch wurde das wie oben dargestellte *l*-Arabinose-methylenthio-benzhydrazid mit 1,05 g *d,l*-Thiomilchsäure in 10 ml 1-n. Salzsäure ausgerührt, wobei sogleich Kristallisation eintrat und dann nach 24 Stunden 3,0 g feinkristallines Pulver vom Schmp. ca. 126°–138° erhalten wurde. Dieses Produkt enthielt 15,84 % S und ergab (in Pyridin)

$$[\alpha]_D^{20} = +372^\circ \rightarrow -41^\circ,1 \text{ und } C_M^{20} = 9,7 \times 10^{-4} \rightarrow 8,8 \times 10^{-4}.$$

Die aus diesem Produkt wie oben gewonnenen Dithiodilactylsäuren schmolzen bei ca. 95°–128° und zeigten das Äquiv.-Gew. 108,4 sowie (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = -24^\circ,0$.

Die Versuche 10 und 11 wurden wie die vorhergehenden ausgeführt, aber mit dem Unterschied, dass hier das Arabinose-methylenthio-benzhydrazid in 3,0 ml Wasser mit der Thiomilchsäure in 2,00 ml 5-n. Salzsäure versetzt wurde. Nach einer halben Stunde wurden hierbei 1,9 g Reaktionsprodukt vom Schmp. 128°–139°, mit 15,76 % S und (in Pyridin)

$$[\alpha]_D^{20} = -475^\circ \rightarrow -171^\circ \text{ und } C_M^{20} = 10,0 \times 10^{-4} \rightarrow 8,7 \times 10^{-4}$$

erhalten; die daraus mittels Jod gewonnenen Dithiodilactylsäuren schmolzen bei ca. 85°–105° und ergaben das Äquiv.-Gew. 110,1 sowie (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = -221^\circ,0$.

Bei dem letzten Versuch wurde das Reaktionsprodukt erst nach 24 Stunden abgesaugt, wobei es mit einer Ausbeute von 1,9 g, vom Schmp. ca. 127°–135°, mit 16,56 % S und (in Pyridin) von

$$[\alpha]_D^{20} = -416^\circ \rightarrow -142^\circ,1 \text{ und } C_M^{20} = 8,6 \times 10^{-4}$$

erhalten wurde. Die daraus dargestellten Dithiodilactylsäuren schmolzen bei ca. 80°–120° und zeigten das Äquiv.-Gew. 110,8 sowie (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = -181^\circ,5$.

Versuche 12–15

Aus 3,5 g eines wie oben dargestellten *l*-Arabinose-methylenthio-benzhydrazids in 5 ml Wasser und 2,4 g *d,l*-Thiomilchsäure in 5 ml 2-n. Salzsäure wurde sogleich eine Emulsion und dann schnell ein Brei aus feinkristallinem Pulver erhalten, welches nach einer halben Stunde und Ausrühren des Breies mit 5 ml Wasser abgesaugt, mit 10 ml Wasser gewaschen und auf Tonscherben getrocknet wurde, wonach es 4,0 g wog, bei 130°–140° schmolz, 15,97, ber. 15,93, % S enthielt und (in Pyridin)

$$[\alpha]_D^{20} = +327^\circ \rightarrow -67^\circ,4 \text{ und } C_M^{20} = 8,6 \times 10^{-4} \rightarrow 8,3 \times 10^{-4}$$

zeigte. Bei der Oxydation mit Jod lieferte das Produkt Dithiodilactylsäuren vom Schmp. ca. 100°–128°, Äquiv.-Gew. 106,7 und (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = -32^\circ,7$, während die aus der bei der ursprünglichen Umsetzung unverbrauchten Thiomilchsäure gewonnenen Dithiodilactylsäuren 0,7 g wogen, bei ca. 100°–125° schmolzen und das Äquiv.-Gew. 105,4 sowie (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = +46^\circ,0$ zeigten.

Bei dem folgenden Versuch wurde in der gleichen Weise verfahren, das Reaktionsprodukt aber erst nach 24 Stunden isoliert. Dieses wog hier 3,4 g, schmolz bei ca. 140°–150°, enthielt 16,03 % S und zeigte (in Pyridin)

$$[\alpha]_D^{20} = -101^\circ \rightarrow -154^\circ,8 \text{ und } C_M^{20} = 8,0 \times 10^{-4} \rightarrow 7,4 \times 10^{-4}.$$

Die daraus gewonnenen Dithiodilactylsäuren schmolzen bei ca. 85° – 127° und zeigten das Äquiv.-Gew. 108,7 und (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = -168^{\circ},1$. — Aus dem Filtrat des Reaktionsproduktes oben wurden 1,1 g Thiomilchsäure und daraus 1,0 g Dithiodilactylsäuren erhalten, welche letzteren bei ca. 100° – 125° schmolzen, das Äquiv.-Gew. 106,2 und (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = +81^{\circ},4$ zeigten.

Der Versuch 14 wurde wie die vorhergehenden ausgeführt, aber mit dem Unterschied, dass hier das *l*-Arabinose-methylthiobenzhydrazid in 3 ml Wasser und die Thiomilchsäure in 2 ml 5-n. Salzsäure gelöst wurden. Nach 1/2 Stunde wurden hier 4,0 g eines Reaktionsproduktes erhalten, welches bei ca. 133° – 142° schmolz, 15,99 % S enthielt und (in Pyridin)

$$[\alpha]_D^{20} = -530^{\circ} \rightarrow -206^{\circ},3 \text{ und } C_M^{20} = 9,8 \times 10^{-4} \rightarrow 8,8 \times 10^{-4}$$

zeigte. Die daraus gewonnenen Dithiodilactylsäuren schmolzen bei ca. 85° – 108° und zeigten das Äquiv.-Gew. 108,9 und (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = -263^{\circ},4$, während die Mutterlauge des ursprünglichen Reaktionsproduktes 0,75 g Thiomilchsäure lieferte und die daraus dargestellten Dithiodilactylsäuren den Schmp. ca. 90° – 105° , das Äquiv.-Gew. 105,1 und (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = +216^{\circ},8$ zeigten.

Versuch 15 ergab wie der Versuch 14, aber erst nach 24 Stunden, 3,8 g eines Produktes vom Schmp. 142° – 148° , mit 15,99 % S und (in Pyridin) von

$$[\alpha]_D^{20} = -586^{\circ} \rightarrow -229^{\circ},3 \text{ und } C_M^{20} = 9,1 \times 10^{-4} \rightarrow 8,3 \times 10^{-4}.$$

Die aus diesem Produkt gewonnenen Dithiodilactylsäuren schmolzen bei ca. 90° – 108° , zeigten das Äquiv.-Gew. 109,4 und (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = -298^{\circ},0$, während aus der Mutterlauge dieses Produktes zum Schluss 0,8 g Dithiodilactylsäuren vom Schmp. ca. 90° – 105° , Äquiv.-Gew. 105,8 und (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = +241^{\circ},9$ erhalten wurden.¹

Versuche 16–17

Beim Schütteln von 5,7 g *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid mit 2,0 g Formalin in 20 ml 1-n. Salzsäure wurde in 5 Minuten eine klare Lösung erhalten, von welcher die Hälfte sogleich mit 2,5 g *d,l*-Thiomilchsäure versetzt wurde. Dabei entstand ein homogenes Gemisch, welches sich schnell und unter schwacher Wärmeentwicklung trübte und in einen Brei aus mikroskopischen, schmalen Prismen überging. Das Produkt wurde nach 1 Stunde abgesaugt, mit 20 ml Wasser gewaschen und an der Luft getrocknet, wonach es 3,5 g wog, bei 130° – 138° schmolz, 15,91, ber. 15,93, % S enthielt und (in Pyridin)

$$[\alpha]_D^{20} = +474^{\circ} \rightarrow -25^{\circ},1 \text{ und } C_M^{20} = 8,7 \times 10^{-4}$$

zeigte. Die daraus mittels Jod usw. gewonnenen Dithiodilactylsäuren schmolzen bei ca. 105° – 125° und zeigten das Äquiv.-Gew. 107,9 sowie (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = +16^{\circ},6$. Das Filtrat des ursprünglichen Reaktionsproduktes lieferte beim Ausäthern 1,5 g eines Extraktes, welcher beim Destillieren 0,9 g Thiomilchsäure ergab. Die daraus gewonnenen Dithiodilactylsäuren schmolzen bei ca. 105° – 130° und ergaben das Äquiv.-Gew. 106,5 sowie (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = -5^{\circ},6$.

Bei dem zweiten Versuch wurde wie oben verfahren, aber das Reaktionsprodukt wurde hier erst nach 24 Stunden abgesaugt. Es wog 3,65 g, schmolz bei ca. 128° – 135° , enthielt 15,92 % S und zeigte (in Pyridin)

$$[\alpha]_D^{20} = +472^{\circ} \rightarrow -28^{\circ},5 \text{ und } C_M^{20} = 8,7 \times 10^{-4}.$$

¹ Nach 72 Stunden wurden 2,6 g unreines Reaktionsprodukt erhalten, und die unverbrauchte Thiomilchsäure lieferte ein Gemisch aus Dithiodilactylsäuren von $[\alpha]_D^{20} = +121^{\circ}$.

Die bei diesem Versuch aus dem Reaktionsprodukt gewonnenen Dithiodilactylsäuren schmolzen bei ca. 105°–128°, ergaben das Äquiv.-Gew. 109,8 und zeigten (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = +13^\circ,1$, während die regenerierte, unverbrauchte Thiomilchsäure 0,8 g wog und ein Gemisch von Dithiodilactylsäuren lieferte, welches bei ca. 103°–130° schmolz und das Äquiv.-Gew. 106,5 sowie (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = -5^\circ,8$ zeigte.

Versuch 18

Aus 3,5 g eines wie beim Versuch 2 dargestellten *l*-Arabinose-methylthiobenzhydrazids und 1,05 g Thiomilchsäure in 10 ml 1-m. Schwefelsäure wurde bald und unter schwacher Wärmentwicklung ein Brei aus sehr feinkristallinem Pulver erhalten, welches nach 24 Stunden abgesaugt, mit 10 ml Wasser gewaschen und auf Tonscherben getrocknet wurde, wonach es 3,4 g wog, bei 127°–137° schmolz, 15,90, ber. 15,93, % S enthielt und (in Pyridin)

$$[\alpha]_D^{20} = +286^\circ \rightarrow -53^\circ,6 \text{ und } C_M^{20} = 8,2 \times 10^{-4}$$

zeigte. Bei der Oxydation mit Jod usw. ergaben 2,8 g des Produktes 0,6 g Dithiodilactylsäuren, welche bei ca. 100°–124° schmolzen und das Äquiv.-Gew. 108,3 sowie (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = -28^\circ,9$ zeigten.

Versuche 19–21

Wie beim Versuch 18, aber mit 2,4 g *d,l*-Thiomilchsäure und Absaugen des Reaktionsproduktes nach einer halben Stunde. Ausbeute 3,8 g, Schmp. 127°–137°, S = 15,93 % und (in Pyridin)

$$[\alpha]_D^{20} = +315^\circ \rightarrow -59^\circ,3 \text{ und } C_M^{20} = 8,6 \times 10^{-4}$$

Die aus dem Reaktionsprodukt wie gewöhnlich gewonnenen Dithiodilactylsäuren schmolzen bei ca. 93°–125° und zeigten das Äquiv.-Gew. 108,5 sowie (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = -34^\circ,6$, während die aus der bei der ursprünglichen Umsetzung unverbrauchten Thiomilchsäure erhaltenen Disulfidsäuren 0,9 g wogen, bei ca. 100°–125° schmolzen und das Äquiv.-Gew. 106,0 sowie (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = +29^\circ,5$ zeigten.

Bei dem nächsten Versuch wurde wie bei dem vorhergehenden verfahren, aber das Reaktionsprodukt wurde hier erst nach 3 Stunden abgesaugt, wonach es 3,7 g wog, bei 142°–148° schmolz, 15,99 % S enthielt und (in Pyridin)

$$[\alpha]_D^{20} = -248^\circ \rightarrow -173^\circ,8 \text{ und } C_M^{20} = 9,3 \times 10^{-4} \rightarrow 8,4 \times 10^{-4}$$

zeigte. Die daraus gewonnenen Dithiodilactylsäuren schmolzen bei ca. 85°–107° und zeigten das Äquiv.-Gew. 109,8 sowie (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = -208^\circ,1$, während die unverbrauchte Thiomilchsäure 0,8 g Disulfidsäuren lieferte, welche bei ca. 90°–118° schmolzen und das Äquiv.-Gew. 105,9 und (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = +158^\circ,1$ zeigten.

Der Versuch 21 wurde wie die beiden vorhergehenden ausgeführt, aber hier wurde das Reaktionsprodukt erst nach 24 Stunden abgesaugt. Ausbeute 3,15 g, Schmp. 148°–151°, S = 15,90 % und (in Pyridin)

$$[\alpha]_D^{20} = -613^\circ \rightarrow -253^\circ,4 \text{ und } C_M^{20} = 8,2 \times 10^{-4}$$

Die aus dem Reaktionsprodukt gewonnenen Dithiodilactylsäuren schmolzen bei ca. 95°–113°, zeigten das Äquiv.-Gew. 109,2 und ergaben (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = -334^\circ,9$, während aus dem Filtrat des ursprünglichen Reaktionsproduktes 1,1 g einer Thiomilchsäure zurückgewonnen wurden, welche Dithiodilactylsäuren vom Schmp. ca. 98°–120°, Äquiv.-Gew. 106,4 und (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = +177^\circ,5$ lieferte.

Versuche 22—24

Wie bei den Versuchen 19–21, aber mit der Thiomilchsäure in 5 ml 1-m. Schwefelsäure, wurden nach einer 1/2 Stunde 3,2 g eines Reaktionsproduktes erhalten, welches bei 130°–140° schmolz, 15,92 % S enthielt und (in Pyridin)

$$[\alpha]_D^{20} = +385^\circ \rightarrow -60^\circ,1 \text{ und } C_M^{20} = 8,7 \times 10^{-4}$$

zeigte. Die daraus gewonnenen Dithiodilactylsäuren schmolzen bei ca. 95°–125° und zeigten das Äquiv.-Gew. 109,0 sowie (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = -33^\circ,7$, während aus dem Filtrat des ursprünglichen Reaktionsproduktes 1,0 g Thiomilchsäure erhalten wurde; die daraus gewonnenen Disulfidsäuren schmolzen bei ca. 103°–126° und zeigten das Äquiv.-Gew. 106,3 sowie (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = +23^\circ,4$.

Bei dem nächsten Versuch wog das nach 3 Stunden erhaltene Reaktionsprodukt 3,8 g, schmolz bei 135°–144°, enthielt 15,99 % S und zeigte (in Pyridin)

$$[\alpha]_D^{20} = -250^\circ \rightarrow -171^\circ,3 \text{ und } C_M^{20} = 10 \times 10^{-4} \rightarrow 9,1 \times 10^{-4}$$

Die aus dem Reaktionsprodukt gewonnenen Dithiodilactylsäuren schmolzen bei ca. 85°–115° und ergaben das Äquiv.-Gew. 108,5 sowie (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = -214^\circ,5$. Die aus dem Filtrat des ursprünglichen Reaktionsproduktes zurückgewonnene Thiomilchsäure wog 0,8 g und lieferte Disulfidsäuren vom Schmp. ca. 95°–120°, Äquiv.-Gew. 105,5 und (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = +180^\circ,1$.

Bei dem Versuch 24 schliesslich wurden nach 24 Stunden 3,5 g eines Reaktionsproduktes erhalten, welches bei 146°–150° schmolz, 15,97 % S enthielt und (in Pyridin)

$$[\alpha]_D^{20} = -607^\circ,5 \rightarrow -235^\circ,2 \text{ und } C_M^{20} = 8,4 \times 10^{-4}$$

zeigte. Die aus diesem Produkt gewonnenen Dithiodilactylsäuren schmolzen bei ca. 88°–112° und zeigten das Äquiv.-Gew. 109,0 sowie (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = -319^\circ,5$, während 0,8 g unverbrauchte Thiomilchsäure erhalten wurde, welche ein Gemisch von Disulfidsäuren vom Schmp. ca. 85°–110°, Äquiv.-Gew. 105,3 und (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = +231^\circ,0$ ergaben.

D. *d,l*-Arabinose-methylthiobenzhydrazid und optisch aktive Thiomilchsäure

Nach 5-stündigem Schütteln eines Gemisches aus je 2,85 g *d*- und *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid mit 20 ml Alkohol, 18 ml Wasser und 2,0 g Formalin war keine Lösung entstanden, und beim Absaugen, Waschen mit 25 ml 50 %-igem Alkohol und Trocknen auf Tonscherben wurden 4,2 g eines aus äusserst kleinen Nadelchen bestehenden Pulvers erhalten, welches gemäss dem Schmp., 157°–159°, und der Analyse aus *d,l*-Arabinose-thiobenzhydrazid bestand.

Für $C_{12}H_{16}O_4N_2S$ (284,33):

ber.: C 50,69,	H 5,67,	N 9,85,	S 11,28 %,
gef.: C 51,23,	H 5,60,	N 9,48,	S 10,96 %.

Da es also nicht möglich war, in dieser Weise das *d,l*-Arabinose-methylthiobenzhydrazid darzustellen, wurden aus je 2,85 g *d*- und *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid, 18 ml Alkohol, 16 ml Wasser und 1,0 g Formalin bereitete Lösungen gemischt und die Mischung auf dem Wasserbad eingedunstet, wobei 9 g eines sirupösen Rückstands erhalten wurden. Nach dem Lösen in 8 ml Wasser wurde dieses Produkt mit 1,1 g

(+)-Thiomilchsäure in 10 ml Wasser versetzt, wobei eine Emulsion entstand, welche ein viskoses Öl ausschied. Im Eisschrank ging das Gemisch in einen Brei aus feinkristallinem Pulver über, welches beim Absaugen und Waschen mit 10 ml Wasser sich teilweise verflüssigte. Die abgesaugte, teigige Masse wurde aus 10 ml gew. Alkohol umkristallisiert, wobei sie 1,3 g farblose, schmale und flache Prismen vom Schmp. 155°–156°,5 lieferte. Diese Methylthiobenzhydrazino-arabinose-thiomilchsäure enthielt 15,83, ber. 15,93, % S und ergab (in Pyridin)

$$[\alpha]_D^{20} = +661^\circ \rightarrow +302^\circ,1 \text{ und } C_M^{20} = 8,7 \times 10^{-4}.$$

Von dem umkristallisierten Präparat wurden 0,7 g mit 10 ml Wasser, 25 ml Äther und 0,3 g Jod geschüttelt, wobei in 5 Minuten homogene Flüssigkeitsschichten entstanden. Von diesen wurde die wässrige mit 1 g Thioglykolsäure versetzt, wobei bald Kristalle sichtbar wurden und am folgenden Tag 0,1 g kleine, nadelförmige Prismen vom Schmp. 128°–130 erhalten wurden. In 50 %-igem Alkohol zeigte diese Methylthiobenzhydrazino-arabinose-thioglykolsäure

$$[\alpha]_D^{20} = -545^\circ \rightarrow +77^\circ,7 \text{ und } C_M^{20} = 16 \times 10^{-4} \rightarrow 21 \times 10^{-4}.$$

E. *l*-Arabinose-methylthiobenzhydrazid und Thiohydracrylsäure

Als 3,4 g eines wie beim Versuch 2, S. 130, erhaltenen, sirupösen *l*-Arabinose-methylthiobenzhydrazids mit 2,5 g Thiohydracrylsäure ausgerührt wurden, entstand ein homogener Sirup, welcher nach dem Zusatz von 5 ml 2-n. Salzsäure schnell in einen Brei aus sehr feinkristallinem Pulver überging. Dieses wurde nach einer halben Stunde abgesaugt, mit 20 ml Wasser gewaschen und auf Tonscherben getrocknet, wonach es 2 g wog, bei 112°–115° schmolz und die Zusammensetzung einer Methylthiobenzhydrazino-arabinose-thiohydracrylsäure zeigte:

Für $C_{16}H_{22}O_6N_2S_2$ (402,48):

ber.: C 47,74, H 5,51, N 6,96, S 15,93 %,
gef.: C 47,63, H 5,48, N 6,96, S 15,87 %.

In 20 ml 50 %-igem Alkohol ergaben 0,4199 g der analysierten Substanz einen etwas unscharfen Umschlag mit Phenolphthalein und 10,70 ml 0,1000-n. Natronlauge, Äquiv.-Gew. 392,4, ber. 402,5, und nach dem Zusatz von weiteren 5,00 ml Lauge wurde die Lösung nach 3 Stunden unscharf durch 4,87 ml 0,1000-n. Salzsäure entfärbt. — In Pyridin auf 10,04 ml gelöst zeigten 0,4595 g derselben Substanz 5 Minuten nach dem Zusatz des Lösungsmittels:

Tabelle 28.

t	$0,5 \alpha_D^{20}$	$C_M^{20} \times 10^4$	t	$0,5 \alpha_D^{20}$	$C_M^{20} \times 10^4$
0	+9°,80	—	690	+1°,90	18,8
5	+9°,64	—	1 320	–0°,18	18,9
20	+9°,38	20,1	2 130	–0°,88	—
40	+9°,00	19,2	2 880	–1°,03	—
80	+8°,27	18,9	3 580	–1°,08	—
170	+6°,87	18,5	4 360	–1°,08	—
360	+4°,42	18,9			

$$[\alpha]_D^{20} = +435^\circ \rightarrow -47^\circ,2 \text{ und } C_M^{20} = 19 \times 10^{-4}.$$

2. *d*-Xylose-methylthiobenzhydrazid und MercaptosäurenA. *d*-Xylose-methylthiobenzhydrazid und Thioglykolsäure

Aus 5,7 g *d*-Xylose-thiobenzhydrazid, 40 ml Alkohol, 38 ml Wasser und 2,0 g Formalin entstand beim Schütteln im Laufe von 10 Minuten eine klare Lösung, von welcher die Hälfte auf dem Wasserbad eingedunstet wurde. Hierbei wurden 3,5 g eines sirupösen Rückstands erhalten, welcher in 10 ml Wasser gelöst und mit 2 g Thioglykolsäure versetzt wurde. Dabei entstand ein homogenes Gemisch, welches nach ca. einer halben Stunde zu kristallisieren begann und bis zum folgenden Tag 3,6 g mit 10 ml Wasser gewaschene und an der Luft getrocknete, schmale, farblose Prismen ausschied. Diese so erhaltene Methylthiobenzhydrazino-*d*-xylose-thioglykolsäure schmolz bei 136°–138° und ergab bei der Analyse:

Für $C_{15}H_{20}O_6N_2S_2$ (388,45):

ber.: C 46,38, H 5,19, N 7,21, S 16,51 %,
gef.: C 45,86, H 5,23, N 7,14, S 16,80 %.

Eine Lösung von 0,2157 g dieses Produktes in Pyridin zu 10,04 ml gelöst zeigte 10 Minuten nach dem Zusatz des Pyridins:

Tabelle 29.

t	α_D^{20}	$C_M^{20} \times 10^4$	t	α_D^{20}	$C_M^{20} \times 10^4$
0	+10°,68	—	1 450	+2°,43	8,4
5	+10°,63	—	2 920	–0°,01	8,4
10	+10°,58	—	4 330	–0°,65	—
120	+9°,52	8,7	5 770	–0°,91	—
250	+8°,34	8,9	7 210	–1°,02	—
490	+6°,60	8,7	8 650	–1°,03	—
730	+5°,22	8,6			

$$[\alpha]_D^{20} = +502^\circ \rightarrow -47^\circ,9 \text{ und } C_M^{20} = 8,6 \times 10^{-4}.$$

Bei einem neuen Versuch wurde das wie oben erhaltene *d*-Xylose-methylthiobenzhydrazid mit 2 g Thioglykolsäure in 5 ml 2-n. Salzsäure versetzt. Die Ausbeute an Reaktionsprodukt vom Schmp. 135°–136° und mit 16,54, ber. 16,51, % S betrug hier 3,4 g und in Pyridin wie oben ergab das Produkt

$$[\alpha]_D^{20} = +506^\circ \rightarrow -47^\circ,6 \text{ und } C_M^{20} = 8,7 \times 10^{-4}.$$

Beim Schütteln von 2,8 g des Produktes mit 15 ml Wasser, 50 ml Äther und 0,9 g Jod entstanden im Laufe von einigen Minuten homogene Flüssigkeitsschichten, welche mit ein wenig Natriumbisulfid entfärbt wurden, wonach die wässrige Schicht bei der freiwilligen Eindunstung zum Schluss in einen braunen Sirup überging. Die ätherische Schicht wurde ungefähr wie S. 126 bearbeitet und lieferte dabei zum Schluss 0,5 g Dithiodiglykolsäure vom Schmp. ca. 100°–105° und Äquiv.-Gew. 93,4, ber. 91,1.

Beim Umkristallisieren von 9 g wie oben erhaltener Methylthiobenzhydrazino-*d*-xylose-thioglykolsäuren aus 90 ml gew. Alkohol wurden 1,8 g mit 10 ml desselben

Alkohols gewaschene, schmale Prismen vom Schmp. 137°–138° erhalten. Dieses Produkt enthielt 16,29 % S und in Pyridin zeigte es

$$[\alpha]_D^{20} = +528^\circ \rightarrow -46^\circ,7 \text{ und } C_M^{20} = 8,8 \times 10^{-4}.$$

Bei der freiwilligen Eindunstung der Mutterlauge des obigen Produktes wurden noch 3 g nadelförmige Prismen erhalten, welche bei 145°–147° schmolzen, 16,27 % S enthielten und in Pyridin

$$[\alpha]_D^{20} = -263^\circ \rightarrow -47^\circ,5 \text{ und } C_M^{20} = 8,7 \times 10^{-4}$$

zeigten.

B. *d*-Xylose-methylthiobenzhydrazid und *d*, *l*-Thiomilchsäure

Versuche 1—2

Beim Versetzen einer Lösung von 3,5 g wie gewöhnlich dargestellten, sirupösen *d*-Xylose-methylthiobenzhydrazids in 5 ml Wasser mit 1,05 g *d*, *l*-Thiomilchsäure in derselben Menge Wasser entstand ein homogenes Gemisch, welches nach ein paar Minuten stark milchig wurde und nach Anreiben in einen Brei aus feinkristallinem Pulver überging. Der Brei wurde nach einer halben Stunde mit 10 ml Wasser ausgerührt und dann das Pulver abgesaugt, mit 10 ml Wasser gewaschen und auf Tonscherben getrocknet, wonach es 3,5 g wog, bei 123°–135° schmolz und die Zusammensetzung einer Methylthiobenzhydrazin-xylose-thiomilchsäure zeigte:

Für $C_{16}H_{22}O_6N_2S_2$ (402,48):

ber.: C 47,74,	H 5,51,	N 6,96,	S 15,93 %,
gef.: C 47,73,	H 5,45,	N 7,00,	S 15,92 %.

Eine Lösung von 0,2400 g des analysierten Produktes in Pyridin zu 10,04 ml gelöst zeigte 10 Minuten nach dem Zusatz des Pyridins:

Tabelle 30.

<i>t</i>	α_D^{20}	$C_M^{20} \times 10^4$	<i>t</i>	α_D^{20}	$C_M^{20} \times 10^4$
0	+11°,46	—	1 450	+2°,60	8,4
5	+11°,40	—	2 890	+0°,02	8,4
10	+11°,35	—	4 330	–0°,78	—
120	+10°,21	8,7	5 770	–1°,04	—
250	+ 9°,04	8,6	7 200	–1°,10	—
490	+ 7°,18	8,5	8 650	–1°,10	—
760	+ 5°,56	8,3			

$$[\alpha]_D^{20} = +484^\circ \rightarrow -46^\circ,0 \text{ und } C_M^{20} = 8,5 \times 10^{-4}.$$

Von demselben Produkt wurden 2,6 g mit 15 ml Wasser, 50 ml Äther und 0,8 g Jod geschüttelt, wobei bald homogene Flüssigkeitsschichten erhalten wurden. Beim Verarbeiten wie S. 126 wurden hieraus zum Schluss 0,5 g Dithiodilactylsäuren gewonnen, welche bei ca. 102°–128° schmolzen, das Äquiv.-Gew. 107,6, ber. 105,1, sowie (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = +5^\circ,7$ zeigten.

Bei einem neuen Versuch wie vorher wurde das Reaktionsprodukt erst nach 24 Stunden abgesaugt, wonach es 3,5 g wog, bei 119°–121° schmolz, 15,90 % S enthielt und (in Pyridin)

$$[\alpha]_D^{20} = +456^\circ \rightarrow -56^\circ,2 \text{ und } C_M^{20} = 8,5 \times 10^{-4}$$

zeigte. Die daraus mittels Jod usw. gewonnenen Dithiodilactylsäuren schmolzen bei ca. 103° – 128° und zeigten das Äquiv.-Gew. 107,2 sowie (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = -9^\circ,4$.

Versuch 3

Beim Verrühren von 3,5 g *d*-Xylose-methylthiobenzhydrazid mit 2,5 g *d,l*-Thiomilchsäure in 10 ml Wasser entstand ein homogenes Gemisch, welches nach ein paar Minuten ein Kristallpulver abzuschneiden begann. Dieses wurde nach 4 Stunden abgesaugt, mit 10 ml Wasser gewaschen und an der Luft getrocknet, wonach es 3,5 g wog, bei 128° – 130° schmolz, 15,90, ber. 15,93, % S enthielt und (in Pyridin)

$$[\alpha]_D^{20} = +493^\circ,5 \rightarrow -45^\circ,5 \text{ und } C_M^{20} = 8,8 \times 10^{-4}$$

zeigte. Aus diesem Produkt durch Oxydation mit Jod usw. gewonnene Dithiodilactylsäuren zeigten (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = +6^\circ,1$. — Das Filtrat des ursprünglichen Reaktionsproduktes ergab beim Ausäthern usw. zum Schluss 1,1 g Dithiodilactylsäuren vom Schmp. ca. 105° – 130° , Äquiv.-Gew. 106,2 und (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = -1^\circ,2$.

Versuche 4—5

Aus 3,5 g *d*-Xylose-methylthiobenzhydrazid in 5 ml Wasser und 2,4 g *d,l*-Thiomilchsäure in 5 ml 2-n. Salzsäure wurde ein homogenes Gemisch erhalten, welches nach einigen Minuten breiartig erstarrte. Nach 30 Minuten wurde der entstandene Brei mit 10 ml Wasser ausgerührt und das dabei ungelöste Pulver abgesaugt, mit 10 ml Wasser gewaschen und auf Tonscherben getrocknet, wonach es 3,7 g wog, bei 124° – 125° schmolz, 15,92 % S enthielt und (in Pyridin)

$$[\alpha]_D^{20} = +499^\circ \rightarrow -41^\circ,1 \text{ und } C_M^{20} = 8,7 \times 10^{-4}$$

zeigte. Die daraus wie oben gewonnenen Dithiodilactylsäuren schmolzen bei ca. 100° – 130° und zeigten das Äquiv.-Gew. 106,8 sowie (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = +13^\circ,3$. — Aus dem Filtrat des ursprünglichen Reaktionsproduktes wurden beim Ausäthern usw. 0,9 g einer Thiomilchsäure erhalten, welche Dithiodilactylsäuren vom Schmp. ca. 103° – 130° , Äquiv.-Gew. 105,9 und (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = -4^\circ,3$ lieferte.

Bei dem folgenden Versuch wurde das Reaktionsprodukt erst nach 24 Stunden isoliert. Es wog 3,85 g, schmolz bei 120° – 122° , enthielt 15,96 % S und zeigte (in Pyridin)

$$[\alpha]_D^{20} = +459^\circ \rightarrow -85^\circ,3 \text{ und } C_M^{20} = 8,6 \times 10^{-4}$$

Die aus dem Reaktionsprodukt gewonnenen Dithiodilactylsäuren schmolzen bei ca. 100° – 126° und zeigten das Äquiv.-Gew. 108,6 sowie (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = -50^\circ,8$, während das Filtrat von jenem Produkt bei der Extraktion mit Äther usw. zum Schluss 0,7 g Dithiodilactylsäuren vom Schmp. ca. 100° – 125° , Äquiv.-Gew. 105,3 und (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = +48^\circ,2$ lieferte.

Versuch 6

Beim Verrühren von 3,4 g eines wie oben dargestellten *d*-Xylose-methylthiobenzhydrazids mit 2,4 g *d,l*-Thiomilchsäure in 5 ml 2-n. Salzsäure entstand sofort eine Emulsion, welche beim Anreiben in einen Brei aus sehr feinkristallinem Pulver überging. Nach 24 Stunden wurde der Brei mit 10 ml Wasser ausgerührt und dann das Pulver abgesaugt, mit 10 ml Wasser gewaschen und auf Tonscherben getrocknet, wonach es 3,2 g wog, bei 120° – 124° schmolz, 15,81 % S enthielt und (in Pyridin)

$$[\alpha]_D^{20} = +447^\circ \rightarrow -90^\circ,8 \text{ und } C_M^{20} = 8,5 \times 10^{-4}$$

zeigte. Die daraus gewonnenen Dithiodilactylsäuren schmolzen bei ca. 100° – 128° und zeigten das Äquiv.-Gew. 107,4 sowie (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = -69^\circ,6$, während aus dem Filtrat des ursprünglichen Reaktionsproduktes 1,1 g einer Thiomilchsäure erhalten wurden, welche Dithiodilactylsäuren vom Schmp. ca. 103° – 128° , Äquiv.-Gew. 105,4 und (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = +40^\circ,8$ lieferte.

3. *d*-Ribose-methylthiobenzhydrazid und *d,l*-Thiomilchsäure

Bei der freiwilligen Eindunstung einer wie S. 114 bereiteten Lösung von *d*-Ribose-methylthiobenzhydrazid wurden 3,3 g eines gummiartigen Rückstands erhalten, welcher mit 2,4 g *d,l*-Thiomilchsäure in 10 ml Wasser ausgerührt wurde. Hierbei entstand ein homogenes Gemisch, welches nach 24 Stunden unverändert war und dann beim Zusatz von 10 ml Wasser nichts ausschied. Beim Schütteln mit 50 ml Äther lieferte das Gemisch drei Schichten, von denen die ätherische beim Abdestillieren des Äthers 1,65 g Rückstand lieferte; bei erneuter Behandlung des Gemisches mit Äther wurden noch 0,5 g eines Destillationsrestes erhalten. Aus den beiden Extrakten wurden beim Destillieren vor der Ölpumpe 0,9 g einer Thiomilchsäure erhalten, welche bei der Oxydation mit Eisenchlorid usw. wie S. 126 0,8 g Dithiodilactylsäuren vom Schmp. ca. 102° – 128° , Äquiv.-Gew. 105,7 und (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = +19^\circ,9$ lieferte. Die bei den Ätherextraktionen entstandenen Unterschichten ergaben bei der Oxydation mit 1 g Jod usw. zum Schluss 0,6 g Dithiodilactylsäuren, welche bei ca. 95° – 120° schmolzen und für 0,34 g in 10 ml Wasser $[\alpha]_D^{20} = -28^\circ,6$ zeigten.

Wie oben, aber mit der Thiomilchsäure in 10 ml 1-n. Salzsäure, wurden aus dem Reaktionsgemisch 1,0 g unverbrauchte Thiomilchsäure zurückgewonnen; die daraus dargestellten Dithiodilactylsäuren schmolzen bei ca. 103° – 125° und zeigten das Äquiv.-Gew. 105,9 sowie (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = +8^\circ,1$, während die beiden Unterschichten mit Jod usw. 0,3 g Dithiodilactylsäuren lieferten, welche bei ca. 100° – 125° schmolzen und das Äquiv.-Gew. 109,5 sowie (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = -20^\circ,2$ zeigten.

4. *d*-Lyxose-methylthiobenzhydrazid und *d,l*-Thiomilchsäure

Beim Verreiben von 3,0 g *d*-Lyxose-methylthiobenzhydrazid mit 2,4 g *d,l*-Thiomilchsäure in 10 ml Wasser entstand ein dünner Brei, welcher nach 24 Stunden unverändert war und dann beim Absaugen und Waschen mit 10 ml Wasser 1,1 g unangegriffenes Lyxose-methylthiobenzhydrazid vom Schmp. 204° – 206° und mit 10,77, ber. 10,82, % S lieferte. Das Filtrat wurde vom Waschwasser stark emulgiert und ergab bei Extraktionen mit 2×50 ml Äther 2,05 + 0,3 = 2,35 g Extrakte, aus denen bei der Destillation wie gewöhnlich 1,35 g Thiomilchsäure erhalten wurden. Die daraus dargestellten Dithiodilactylsäuren schmolzen bei ca. 103° – 130° und zeigten das Äquiv.-Gew. 106,0 sowie (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = -2^\circ,5$. Weder der Destillationsrückstand, noch die extrahierte Lösung lieferte bei der weiteren Bearbeitung etwas von Interesse.

Bei einem neuen Versuch, aber mit der Thiomilchsäure in 10 ml 1-n. Salzsäure, bestand das Reaktionsgemisch nach 24 Stunden aus einer wässerigen Schicht und einem viskosen, gelbbraunen Öl. Beim Ausschütteln mit Äther usw. wie oben wurden

1,4 g Thiomilchsäure zurückgewonnen; daraus wurden Dithiodilactylsäuren erhalten, welche bei ca. 103°–125° schmolzen und das Äquiv.-Gew. 106,3 sowie (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = +2^{\circ},3$ zeigten.

5. *l*-Rhamnose-methylthiobenzhydrazid und Thiomilchsäuren

Versuche 1—2

Da das *l*-Rhamnose-methylthiobenzhydrazid sich nur langsam mit Thiomilchsäure umsetzt, wurden die definitiven Versuche hierüber in salzsauren Lösungen ausgeführt. Hierbei wurden zuerst 3,1 g des Thiohydrazids mit 1,2 g (+)-Thiomilchsäure in 5 ml 2-n. Salzsäure zusammengerieben, und als nach 15 Minuten 10 ml Wasser hinzugefügt worden waren, ergab das Gemisch beim Absaugen, Waschen mit 10 ml Wasser und Trocknen auf Tonscherben 3,7 g eines Pulvers vom Schmp. 151°–164°, mit 14,58, ber. 15,39, % S und für 0,2054 g in Pyridin zu 10,04 ml gelöst 10 Minuten nach dem Zusatz des Lösungsmittels:

Tabelle 31.

<i>t</i>	$0,947 \alpha_D^{20}$	$C_M^{20} \times 10^4$	<i>t</i>	$0,947 \alpha_D^{20}$	$C_M^{20} \times 10^4$
0	+9°,55	—	360	+4°,76	29,1
5	+9°,42	—	720	+3°,25	26,7
10	+9°,30	—	2 170	+2°,34	—
40	+8°,62	33,7	5 840	+2°,18	—
90	+7°,70	32,1	7 220	+2°,18	—
180	+6°,44	30,5			

$$[\alpha]_D^{20} = +510^{\circ} \rightarrow +113^{\circ} \text{ und } C_M^{20} = 34 \times 10^{-4} \rightarrow 27 \times 10^{-4}.$$

Beim nächsten Versuch wurden 3,1 g *l*-Rhamnose-methylthiobenzhydrazid mit 2,5 g der (+)-Thiomilchsäure in 5 ml 2-n. Salzsäure verrührt und das Gemisch nach 4 Stunden wie oben bearbeitet, wobei 3,7 g eines feinkristallinen Pulvers gewonnen wurden, welches bei 150°–160° schmolz, 15,59, ber. 15,39, % S enthielt und in Pyridin

$$[\alpha]_D^{20} = +645^{\circ} \rightarrow +188^{\circ},2 \text{ und } C_M^{20} = 31 \times 10^{-4} \rightarrow 29 \times 10^{-4}$$

zeigte. — Bei der Oxydation von 3,2 g des Produktes mit 1,0 g Jod in 20 ml Wasser und 50 ml Äther wurden 2,2 g eines mit 10 ml Wasser gewaschenen Pulvers vom Schmp. ca. 195°–200° erhalten, welches beim Umkristallisieren aus 50 %-igem Alkohol reines, regeneriertes *l*-Rhamnose-methylthiobenzhydrazid vom Schmp. 209°–211° und (in Pyridin) von $[\alpha]_D^{20} = -166^{\circ},3$ lieferte. Die vom Äther ausgezogene Dithiodilactylsäure wog nach Reinigung wie S. 126 0,7 g, schmolz bei 114°–118° und zeigte das Äquiv.-Gew. 107,9 sowie (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = +415^{\circ},3$, während aus dem Filtrat des ursprünglichen Reaktionsproduktes 1,1 g einer Thiomilchsäure erhalten wurden, welche eine Dithiodilactylsäure vom Schmp. 115°–118°, Äquiv.-Gew. 106,0 und (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = +417^{\circ},1$ ergab.

Versuche 3—4

Nach 1/4-stündigem Reiben von 3,1 g *l*-Rhamnose-methylthiobenzhydrazid mit 1,2 g (–)-Thiomilchsäure in 5 ml 2-n. Salzsäure enthielt das Gemisch eine ölige

Kristallmasse, welche nach dem Zusatz von 10 ml Wasser beim Absaugen usw. 2,2 g unverbrauchtes *l*-Rhamnose-methylthiobenzhydrazid vom Schmp. 208°–210° lieferte. Das Filtrat davon wurde mit 50 ml Äther ausgeschüttelt, wonach dieser gegen Phenolphthalein 14 ml 1-n. Natronlauge verbrauchte; aus der so erhaltenen, wässrigen Lösung wurde nach Zusatz von etwas Eisenchlorid usw. zum Schluss eine Dithiodilactylsäure gewonnen, welche bei 114°–117° schmolz und das Äquiv.-Gew. 106,0 sowie (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = -406^\circ$ zeigte.

Bei einem neuen Versuch wie vorher, aber mit 2,5 g (-)-Thiomilchsäure und Verarbeiten des Gemisches nach 4 Stunden, wurden 0,8 g unreines *l*-Rhamnose-methylthiobenzhydrazid zurückgewonnen, die unverbrauchte Thiomilchsäure lieferte eine Dithiodilactylsäure vom Schmp. 114°–117°, Äquiv.-Gew. 106,2 und für 0,4 g in 10 ml Wasser $[\alpha]_D^{20} = -396^\circ$, während im übrigen nichts von Interesse gewonnen werden konnte.

Versuche 5–7

Nach 1/4-stündigem Reiben von 3,1 g *l*-Rhamnose-methylthiobenzhydrazid mit 2,5 g *d,l*-Thiomilchsäure in 5 ml 2-n. Salzsäure und Zusatz von 10 ml Wasser wurden beim Absaugen, Waschen mit 10 ml Wasser und Trocknen auf Tonscherben 2,8 g eines feinkristallinen Pulvers erhalten, welches bei 152°–160° schmolz, 14,80, ber. 15,39, % S enthielt und (in Pyridin)

$$[\alpha]_D^{20} = +506^\circ \rightarrow +108^\circ,7 \text{ und } C_M^{20} = 30 \times 10^{-4}$$

zeigte. Aus 2,3 g dieses Produktes wurden mit 0,7 g Jod usw. 1,7 g *l*-Rhamnose-methylthiobenzhydrazid vom Schmp. 203°–207° erhalten; das Filtrat davon ergab beim Ausäthern usw. zum Schluss 0,6 g Dithiodilactylsäuren vom Schmp. ca. 100°–115°, Äquiv.-Gew. 107,5 und (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = +360^\circ$, während aus dem Filtrat des ursprünglichen Reaktionsproduktes durch Ausäthern usw. 1,2 g einer unverbrauchten Thiomilchsäure gewonnen wurden, welche Dithiodilactylsäuren vom Schmp. ca. 92°–125°, Äquiv.-Gew. 106,5 und (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = -145^\circ,0$ lieferte.

Beim Versuch 6 wurde wie oben verfahren, aber das Reaktionsprodukt wurde hier erst nach einer Stunde abgesaugt. Ausbeute 2,6 g, Schmp. ca. 130°–160°, S = 16,49 % und (in Pyridin)

$$[\alpha]_D^{20} = +452^\circ \rightarrow +103^\circ,1 \text{ und } C_M^{20} = 31 \times 10^{-4}$$

Die aus dem Reaktionsprodukt gewonnenen Dithiodilactylsäuren schmolzen bei ca. 90°–120° und zeigten das Äquiv.-Gew. 108,2 sowie (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = +219^\circ,4$, während aus dem Filtrat jenes Produktes 1,1 g Thiomilchsäure regeneriert wurden, welche Dithiodilactylsäuren vom Schmp. ca. 100°–125°, Äquiv.-Gew. 106,0 und (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = -85^\circ,7$ ergaben.

Als 2 g einer wie oben gewonnenen Methylthiobenzhydrazino-*l*-rhamnose-thiomilchsäure aus 10 ml gew. Alkohol umkristallisiert wurden, schied die Lösung beim Erkalten 0,5 g flache Prismen vom Schmp. 156°–162° und der richtigen Zusammensetzung aus:

Für $C_{17}H_{24}O_6N_2S_2$ (416,50):

ber.: C 49,02,	H 5,81,	N 6,73,	S 15,39 %,
gef.: C 49,18,	H 5,90,	N 6,79,	S 15,42 %.

Von diesem Produkt zeigten 0,4402 g in Pyridin zu 10,04 ml gelöst 15 Minuten nach dem Zusatz des Lösungsmittels:

Tabelle 32.

t	α_D^{20}	$C_M^{20} \times 10^4$	t	α_D^{20}	$C_M^{20} \times 10^4$
0	+26°,37	—	180	+18°,12	33,1
5	+26°,12	—	535	+11°,18	32,7
10	+25°,87	—	1 200	+ 8°,40	31,5
20	+25°,22	32,3	1 900	+ 8°,04	—
40	+24°,14	32,3	2 660	+ 7°,98	—
80	+22°,14	32,7	3 340	+ 7°,98	—

$$[\alpha]_D^{20} = +619^\circ \rightarrow +182^\circ \text{ und } C_M^{20} = 32 \times 10^{-4}.$$

Bei dem letzten, im übrigen wie bei den beiden anderen ausgeführten Versuch wurde das Reaktionsprodukt nach 4 Stunden abgesaugt usw., wonach es 2,4 g wog, bei ca. 110°–150° schmolz, 16,34 % S enthielt und (in Pyridin)

$$[\alpha]_D^{20} = +440^\circ \rightarrow +102^\circ,8 \text{ und } C_M^{20} = 36 \times 10^{-4} \rightarrow 30 \times 10^{-4}$$

zeigte. Die daraus gewonnenen Dithiodilactylsäuren zeigten den Schmp. ca. 90°–115°, das Äquiv.-Gew. 108,2 und (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = +215^\circ,9$, während aus dem Filtrat des ursprünglichen Reaktionsproduktes 1,25 g Thiomilchsäure regeneriert wurden, und die daraus erhaltenen Dithiodilactylsäuren bei ca. 98°–125° schmolzen und das Äquiv.-Gew. 106,7 sowie (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = -71^\circ,6$ zeigten.

6. *d*-Glucose-methylenthio benzhydrazid und *d,l*-Thiomilchsäure

Versuch 1

Beim Verreiben von 3,25 g *d*-Glucose-methylenthio benzhydrazid mit 1,1 g *d,l*-Thiomilchsäure in 10 ml Wasser entstand ein dünner Brei, welcher allmählich dicker wurde und nach 24 Stunden mit 10 ml Wasser ausgerührt wurde, wonach beim Absaugen, Waschen mit 10 ml Wasser und Trocknen an der Luft 2,4 g eines Pulvers vom Schmp. 131°–132° (–143°) erhalten wurden. Der Analyse gemäss bestand dieses Produkt aus einem Gemisch von unverbrauchtem Glucose-methylenthio benzhydrazid und neugebildeter Methylenthio benzhydrazino-glucose-thiomilchsäure im Mol.-Verhältnis 1 : 2:

Für $0,33 \text{ C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_5\text{N}_2\text{S} + 0,67 \text{ C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_7\text{N}_2\text{S}_2$ (397,47):

ber.: C 48,37, H 5,58, N 7,05, S 13,47 %.

gef.: C 48,48, H 5,48, N 7,03, S 13,37 %.

Tabelle 33.

t	α_D^{20}	α_D^{20} , korrr.	$C_M^{20} \times 10^4$	t	α_D^{20}	α_D^{20} , korrr.	$C_M^{20} \times 10^4$
0	+8°,16	+9°,31	—	720	+4°,12	+5°,27	10,0
5	+8°,12	+9°,27	—	1 440	+2°,22	+3°,37	9,8
10	+8°,08	+9°,23	—	2 160	+1°,24	+2°,39	9,9
80	+7°,60	+8°,75	9,25	4 500	+0°,38	+1°,53	—
160	+7°,04	+8°,19	9,6	10 400	+0°,31	+1°,46	—
360	+5°,78	+6°,93	10,0	11 130	+0°,31	+1°,46	—

Eine Lösung von 0,2583 g dieses Gemisches in Pyridin zu 10,04 ml gelöst zeigte 20 Minuten nach dem Zusatz des Lösungsmittels und nach weiteren t Minuten die Drehungen α_D^{20} , welche bei Korrekturen für die Drehung des anwesenden Glucose-methylen-thiobenzhydrazids als Drehungswerte des Thiomilchsäure-Derivates die mit α_D^{20} , *korr.* bezeichneten Werte der Tabelle 33 lieferten; aus diesen wurde so die Geschwindigkeitskonstante C_M^{20} der Mutarotation dieses Derivates berechnet.

Aus den angeführten Zahlen erhält man für die unter diesen Umständen gebildete Methylthiobenzhydrazino-*d*-glucose-thiomilchsäure

$$[\alpha]_D^{20} = +504^\circ \rightarrow +78^\circ \text{ und } C_M^{20} = 9,8 \times 10^{-4}.$$

Versuche 2—3

Nach dem Behandeln des Glucose-methylthiobenzhydrazids wie beim Versuch 1 mit 2,5 g Thiomilchsäure in 10 ml Wasser wurden nach 4 Stunden 2,6 g eines Produktes erhalten, welches bei 133°–135° schmolz und sich von der richtigen Zusammensetzung erwies:

Für $C_{17}H_{24}O_7N_2S_2$ (432,50):

ber.:	C 47,21,	H 5,59,	N 6,48,	S 14,83 %,
gef.:	C 47,59,	H 5,52,	N 6,44,	S 14,59 %.

In Pyridin wie oben zeigte dieses Produkt

$$[\alpha]_D^{20} = +489^\circ \rightarrow +68^\circ,7 \text{ und } C_M^{20} = 9,3 \times 10^{-4};$$

als 1,7 g davon mit 10 ml Wasser, 30 ml Äther und 0,6 g Jod geschüttelt wurden, war nach einer halben Stunde keine Lösung entstanden. Nach Entfärben mit ein wenig Natriumbisulfit ergab dann das Gemisch beim Absaugen 1,1 g nadelförmige Prismen, welche bei 183°–185° schmolzen, (in Pyridin) $[\alpha]_D^{20} = -157^\circ$ zeigten und auch durch die Analyse als regeneriertes Glucose-methylthiobenzhydrazid identifiziert wurden:

Für $C_{14}H_{18}O_5N_2S$ (326,36):

ber.:	C 51,52,	H 5,56,	N 8,58,	S 9,82 %,
gef.:	C 51,43,	H 5,62,	N 8,60,	S 9,80 %.

Die ätherische Lösung lieferte Dithiodilactylsäuren von (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = +214^\circ,5$, während aus dem Filtrat des ursprünglichen Reaktionsproduktes 1,2 g einer Thiomilchsäure zurückgewonnen wurden, welche Dithiodilactylsäuren vom Schmp. ca. 100°–128°, Äquiv.-Gew. 105,9 und (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = -53^\circ,0$ lieferte.

Beim Versuch 3 wurde wie bei dem vorhergehenden verfahren, aber das Reaktionsprodukt wurde hier erst nach 24 Stunden isoliert. Es wog 2,3 g, schmolz bei 133°–135°, enthielt 14,76 % S und ergab (in Pyridin)

$$[\alpha]_D^{20} = +524^\circ \rightarrow +96^\circ,0 \text{ und } C_M^{20} = 8,7 \times 10^{-4}.$$

Die aus diesem Produkt mittels Jod erhaltenen Dithiodilactylsäuren schmolzen bei ca. 90°–100° und zeigten das Äquiv.-Gew. 107,6 sowie (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = +228^\circ$, während aus dem Filtrat desselben Produktes 1,0 g einer Thiomilchsäure zurückgewonnen wurden, welche Dithiodilactylsäuren vom Schmp. ca. 102°–128°, Äquiv.-Gew. 105,7 und (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = -54^\circ,6$ ergab.

Versuche 4—5

Bei einstündigem Verreiben von 3,25 g *d*-Glucose-methylthiobenzhydrazid mit 2,5 g *d,l*-Thiomilchsäure entstand eine homogene Flüssigkeit, welche nach Zusatz

von 20 ml Wasser nur eine Spur eines Pulvers ausschied. Das Filtrat davon ergab beim Ausäthern usw. 1,0 g einer Thiomilchsäure, welche Dithiodilactylsäuren vom Schmp. ca. 105° – 128° , Äquiv.-Gew. 106,2 und (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = +12^{\circ},1$ lieferte. Im übrigen ergab das Reaktionsgemisch beim weiteren Verarbeiten nichts Einheitliches.

Bei dem letzten Versuch wurde wie bei dem vorhergehenden verfahren, aber mit dem Unterschied, dass hier die Thiomilchsäure in 10 ml 1-n. Salzsäure gelöst war und die Reaktionszeit auf 24 Stunden ausgedehnt wurde, wonach das immer noch flüssige Gemisch beim Ausäthern usw. 1,6 g Thiomilchsäure lieferte. Die daraus gewonnenen Dithiodilactylsäuren schmolzen bei ca. 105° – 130° und zeigten das Äquiv.-Gew. 106,0 sowie (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = +2^{\circ},9$. Auch hier gelang es nicht, andere einheitliche Produkte zu isolieren.

7. *d*-Mannose-methylthiobenzhydrazid und *d,l*-Thiomilchsäure

Versuch 1

Beim Verreiben von 3,4 g *d*-Mannose-methylthiobenzhydrazid mit 2,5 g *d,l*-Thiomilchsäure in 10 ml Wasser entstand im Laufe einer Stunde ein homogenes Gemisch, welches nach weiteren 3 Stunden eine geringe Menge Kristalle ausgeschieden hatte und dann nach dem Zusatz von 20 ml Wasser beim Absaugen und Waschen mit 10 ml Wasser 0,8 g kleine, an der Luft getrocknete Prismen ergab. Dieses Produkt schmolz bei 87° – 89° und zeigte sich bei der Analyse als aus mit einem Mol. Wasser kristallisierter Methylthiobenzhydrazino-mannosethiomilchsäure zu bestehen: Gewichtsverlust im Vakuum über Phosphorsäureanhydrid 4,01 % und:

Für $C_{17}H_{26}O_8N_2S_2$ (450,51):

ber.: C 45,32,	H 5,82,	N 6,22,	S 14,23,	H ₂ O 4,00 %,
gef.: C 45,48,	H 5,83,	N 6,21,	S 14,27,	H ₂ O 4,01 %.

Von dem getrockneten Produkt zeigten 0,2655 g in Pyridin zu 10,04 ml gelöst 10 Minuten nach dem Zusatz des Lösungsmittels:

Tabelle 34.

<i>t</i>	α_D^{20}	$C_M^{20} \times 10^4$	<i>t</i>	α_D^{20}	$C_M^{20} \times 10^4$
0	+6°,37	—	320	+2°,19	30,0
5	+6°,26	—	640	+0°,60	30,0
10	+6°,15	—	1 370	-0°,33	—
40	+5°,59	30,6	2 080	-0°,40	—
80	+4°,90	30,6	5 800	-0°,40	—
160	+3°,82	29,5			

$$[\alpha]_D^{20} = +249^{\circ} \rightarrow -15^{\circ},1 \text{ und } C_M^{20} = 30 \times 10^{-4}.$$

Aus dem Filtrat des Reaktionsproduktes wurden beim Ausäthern usw. 1,2 g einer Thiomilchsäure erhalten, welche Dithiodilactylsäuren vom Schmp. ca. 103° – 128° , Äquiv.-Gew. 105,9 und (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = +1^{\circ},0$ lieferte.

Versuch 2

Wie oben, aber mit der Thiomilchsäure in 10 ml 1-n. Salzsäure, wurde eine homogene Lösung erhalten, welche bald eine teigige Kristallmasse abzuscheiden begann. Nach 24 Stunden wurden 10 ml Wasser zugesetzt, wonach beim Absaugen, Waschen mit 10 ml Wasser und Trocknen auf Tonscherben 2,7 g einer teigigen Masse erhalten wurden, welche bei der Behandlung mit 50 ml heissem Alkohol 0,35 g Kristallpulver vom Schmp. 186°–187° und der Zusammensetzung des Mannose-thiobenzhydrazids als ungelösten Rest zurückliess.

Für $C_{13}H_{18}O_5N_2S$ (314,35):

ber.:	C 49,67,	H 5,77,	N 8,91,	S 10,20 %,
gef.:	C 49,68,	H 5,81,	N 8,92,	S 10,15 %.

Die erhaltene Lösung schied beim Erkalten 0,25 g dünne Täfelchen vom Schmp. 184°–186° aus und ergab im übrigen nichts von Interesse. — Das Filtrat des ursprünglichen Reaktionsproduktes ergab beim Ausäthern usw. 1,3 g einer unverbrauchten Thiomilchsäure, welche Dithiodilactylsäuren vom Schmp. ca. 104°–128°, Äquiv.-Gew. 105,4 und (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = +9^\circ,6$ lieferte.

Versuch 3

Bei einem Versuch wie die vorhergehenden, aber mit der Thiomilchsäure in 5 ml 2-n. Salzsäure, war die zuerst entstandene Lösung nach einer Stunde etwas getrübt; beim Zusatz von 20 ml Wasser schied sie dann 1,2 g Methylthiobenzhydrazino-*d*-mannose-thiomilchsäure als feinkristallines Pulver aus, welches bei 88°–90° schmolz und bei der Analyse

ber.:	S 14,23,	H ₂ O 4,00 %;	gef.:	S 14,31,	H ₂ O 3,99 %,
-------	----------	--------------------------	-------	----------	--------------------------

ergab. Eine getrocknete Probe davon zeigte (in Pyridin)

$$[\alpha]_D^{20} = +237^\circ \rightarrow -35^\circ,4 \text{ und } C_M^{20} = 30 \times 10^{-4} \rightarrow 27 \times 10^{-4}.$$

Nach Extrahieren des Filtrates mit Äther schied dieses bis zum folgenden Tag 2,0 g kleine Kristallaggregate vom Schmp. ca. 130°–140° aus, und beim Behandeln von 0,8 g davon mit 1 g Soda in 10 ml Wasser verblieben 0,35 g unreines Mannose-thiobenzhydrazid vom Schmp. 177°–179° mit

ber.:	C 49,67,	H 5,77,	N 8,91,	S 10,20 %,
gef.:	C 49,73,	H 5,76,	N 9,18,	S 10,44 %,

ungelöst, während die erhaltene Lösung beim Ansäuern zuerst emulgiert wurde und dann klebrige Massen ausschied. — Aus dem Ätherextrakt wurden 0,95 g einer Thiomilchsäure erhalten, welche Dithiodilactylsäuren vom Schmp. ca. 100°–126°, Äquiv.-Gew. 105,5 und (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = +18^\circ,9$ lieferte.

8. *d*-Galaktose-methylthiobenzhydrazid und *d*,*l*-Thiomilchsäure

Versuch 1

Beim Verreiben von 3,5 g *d*-Galaktose-methylthiobenzhydrazid mit 2,5 g *d*,*l*-Thiomilchsäure in 10 ml Wasser entstand eine homogene Flüssigkeit, welche schnell in einen Brei aus kleinen, schmalen Prismen überging. Nach einer halben Stunde wurden 20 ml Wasser zugesetzt und dann das Pulver abgesaugt, mit 10 ml Wasser

gewaschen und an der Luft getrocknet, wonach es 4,2 g wog, bei 129°–131° schmolz, im Vakuum über Phosphorsäureanhydrid 2,15, für 1/2 H₂O ber. 2,02, % an Gewicht verlor und dann die Zusammensetzung einer Methylenthio benzhydrazino-galaktose-thiomilchsäure zeigte:

Für C₁₇H₂₄O₇N₂S₂ (432,50):

ber.: C 47,21, H 5,59, N 6,48, S 14,83 %,
gef.: C 47,29, H 5,34, N 6,56, S 14,82 %.

Eine Lösung von 0,2586 g der getrockneten Probe in Pyridin zu 10,04 ml gelöst zeigte 10 Minuten nach dem Zusatz des Lösungsmittels:

Tabelle 35.

<i>t</i>	α_D^{20}	$C_M^{20} \times 10^4$	<i>t</i>	α_D^{20}	$C_M^{20} \times 10^4$
0	+11°,07	—	1 350	+3°,13	8,2
5	+11°,02	—	2 110	+1°,32	8,2
10	+10°,97	—	2 830	+0°,32	8,4
80	+10°,29	8,6	4 270	-0°,40	—
160	+ 9°,54	8,6	8 710	-0°,78	—
320	+ 8°,29	8,4	10 030	-0°,78	—
670	+ 6°,02	8,3			

$$[\alpha]_D^{20} = +434^\circ \rightarrow -30^\circ,3 \text{ und } C_M^{20} = 8,4 \times 10^{-4}.$$

Beim Schütteln von 3 g des Produktes mit 0,8 g Jod, 20 ml Wasser und 50 ml Äther entstand ein gelblicher Brei eines feinkörnigen Pulvers, welches nach einer Stunde abgesaugt, mit 10 ml Wasser gewaschen und auf Tonscherben getrocknet wurde, wonach es 1,3 g wog und bei 142°–144° schmolz. Beim Umkristallisieren aus gew. Alkohol ergab das Produkt reines *d*-Galaktose-methylenthio benzhydrazid als farblose, dünne und schmale Täfelchen vom Schmp. 150°–151° und der Zusammensetzung:

Für C₁₄H₁₈O₅N₂S (326,36):

ber.: C 51,52, H 5,56, N 8,58, S 9,82 %,
gef.: C 51,63, H 5,62, N 8,62, S 9,78 %.

Eine Lösung von 0,3153 g des Produktes in Pyridin zu 10,04 ml zeigte 10 Minuten nach dem Zusatz des Lösungsmittels:

<i>t</i> :	0	10	30	60	120	260	380
α_D^{20} :	+5°,02	+4°,98	+4°,90	+4°,80	+4°,69	+4°,62	+4°,62

$$[\alpha]_D^{20} = +161^\circ \rightarrow +147^\circ,1.$$

Aus der Ätherlösung wurden zum Schluss 0,8 g Dithiodilactylsäuren gewonnen, welche (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = -3^\circ,6$ zeigten. — Das Filtrat aus dem ursprünglichen Reaktionsprodukt ergab beim Ausäthern usw. 1,1 g einer Thiomilchsäure, welche Dithiodilactylsäuren vom Schmp. ca. 102°–130°, Äquiv.-Gew. 105,4 und (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = +3^\circ,2$ lieferte.

Versuche 2—3

Wie oben, aber Absaugen des Reaktionsproduktes nach 4 Stunden. Ausbeute 3,9 g, Schmp. 128°–130°, Gewichtsverlust im Vakuum über Phosphorsäureanhydrid 2,16 %, dann S = 14,84, ber. 14,83, % und in Pyridin wie oben

$$[\alpha]_D^{20} = +421^\circ \rightarrow -46^\circ,5 \text{ und } C_M^{20} = 8,7 \times 10^{-4}.$$

Die aus diesem Produkt mittels Jod usw. erhaltenen Dithiodilactylsäuren zeigten (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = -30^\circ,3$, während das Filtrat aus dem ursprünglichen Reaktionsprodukt beim Ausäthern usw. 1,1 g einer Thiomilchsäure ergab, welche Dithiodilactylsäuren vom Schmp. ca. 102°–128°, Äquiv.-Gew. 105,9 und (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = +19^\circ,9$ lieferte.

Beim Versuch 3 wurden wie oben, aber nach 24 Stunden, 3,8 g eines Reaktionsproduktes erhalten, welches bei 129°–131° schmolz, 2,10 % Feuchtigkeit und in trockener Form 14,82 % S enthielt und in Pyridin wie oben

$$[\alpha]_D^{20} = +408^\circ \rightarrow -77^\circ,2 \text{ und } C_M^{20} = 9,0 \times 10^{-4}$$

ergab. Die daraus wie gewöhnlich gewonnenen Dithiodilactylsäuren schmolzen bei ca. 98°–125° und zeigten das Äquiv.-Gew. 106,4 sowie (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = -80^\circ,0$, während aus dem Filtrat des ursprünglichen Reaktionsproduktes beim Ausäthern usw. 1,0 g einer Thiomilchsäure erhalten wurden, welche Dithiodilactylsäuren vom Schmp. ca. 101°–128°, Äquiv.-Gew. 105,9 und (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = +54^\circ,3$ lieferte.

Versuche 4—6

Wie oben, aber mit der Thiomilchsäure in 10 ml 1-n. Salzsäure, wurden nach einer Stunde 4,1 g Methylthiobenzhydrazino-*d*-galaktose-thiomilchsäure als schmale Prismen vom Schmp. 128°–130° erhalten. Das Produkt enthielt 2,20 % Wasser und nach dem Trocknen 14,82 % S; in Pyridin wie gewöhnlich ergab es

$$[\alpha]_D^{20} = +411^\circ \rightarrow -62^\circ,7 \text{ und } C_M^{20} = 10,4 \times 10^{-4}.$$

Die aus dem Reaktionsprodukt gewonnenen Dithiodilactylsäuren schmolzen bei ca. 100°–125° und zeigten das Äquiv.-Gew. 107,2 sowie (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = -51^\circ,9$, während aus seiner Mutterlauge 1,05 g einer unverbrauchten Thiomilchsäure erhalten wurden, welche Dithiodilactylsäuren vom Schmp. ca. 104°–126°, Äquiv.-Gew. 105,9 und (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = +41^\circ,8$ lieferte.

Bei einem neuen Versuch wie oben wurde das Reaktionsgemisch längere Zeit sich selbst überlassen, wobei das ausgeschiedene Pulver allmählich wieder in Lösung ging; nach 6 Stunden war ein fast homogenes Gemisch entstanden, welches nach Zusatz von 10 ml Wasser mit 2 × 50 ml Äther extrahiert wurde. Beim Abdestillieren des Äthers blieben 3 g eines Extraktes als Rest zurück; dieser lieferte dann vor der Ölpumpe 1,3 g einer Thiomilchsäure, welche Dithiodilactylsäuren vom Schmp. ca. 105°–128°, Äquiv.-Gew. 105,9 und (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = +1^\circ,0$ ergab.

Bei dem letzten Versuch wurden wie bei dem vorhergehenden, aber nach 24 Stunden, 3,4 g eines Ätherextraktes erhalten, welcher 1,7 g Thiomilchsäure lieferte; die daraus gewonnenen Dithiodilactylsäuren schmolzen bei ca. 105°–128°, zeigten das Äquiv.-Gew. 105,5, aber in Wasserlösung keine optische Aktivität.

9. *d*-Fructose-methylthiobenzhydrazid und *d*,*l*-Thiomilchsäure

Beim Zusammenreiben von 3,3 g *d*-Fructose-methylthiobenzhydrazid mit 2,4 g *d*,*l*-Thiomilchsäure in 10 ml Wasser entstand ein dünner Brei, welcher nach 24 Stunden mit 10 ml Wasser verdünnt wurde, wonach er beim Absaugen, Waschen mit 10 ml Wasser und Trocknen auf Tonscherben 0,6 g unverbrauchtes Ausgangsmaterial vom Schmp. 172°–174° und mit 9,84, ber. 9,82, % S lieferte. Aus dem Filtrat wurden 1,5 g einer Thiomilchsäure erhalten, welche Dithiodilactylsäuren vom Schmp. ca. 104°–128°, Äquiv.-Gew. 105,9 und (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = -12^{\circ},9$ ergab.

Bei einem neuen Versuch wie der vorhergehende, aber mit der Thiomilchsäure in 10 ml 1-n. Salzsäure, bestand das Reaktionsgemisch nach 24 Stunden aus einer wässrigen Lösung und einer opaken, halbfesten Masse, welche nach dem Zusatz von Wasser nicht verändert wurde. Die davon abdekantierte, wässrige Lösung ergab 1,2 g einer Thiomilchsäure, welche Dithiodilactylsäuren vom Schmp. ca. 104°–125°, Äquiv.-Gew. 105,9 und (in Wasser) $[\alpha]_D^{20} = +1^{\circ},7$ lieferte.

VII. Versuche mit Zuckergemischen

1. Versuche mit *l*-Arabinose und *d*-Xylose

Beim Versetzen einer Lösung von 1,5 g *l*-Arabinose und der gleichen Menge *d*-Xylose in 15 ml Wasser mit 3,05 g Thiobenzhydrazid in 15 ml Alkohol entstand ein homogenes Gemisch, welches bis zum folgenden Tag 2,1 g reines *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid vom Schmp. 166°–167° und in Natronlauge, wie S. 47, von $[\alpha]_D^{20} = +49^{\circ},3$ ausschied. Bei der freiwilligen Eindunstung der Mutterlauge wurden 2,9 g einer Kristallmasse erhalten, welche bei ca. 115°–120° schmolz und in Natronlauge wie oben $[\alpha]_D^{20} = +29^{\circ},9$ zeigte. Diesem Drehungsvermögen entspricht die Zusammensetzung 24,5 % *l*-Arabinose- und 75,5 % *d*-Xylose-thiobenzhydrazid; als eine Lösung von 2,5 g dieses Gemisches in 20 ml 0,5-n. Natronlauge mit 5 ml 2-n. Essigsäure versetzt wurde, trat keine weitere Separierung ein, denn dabei wurden 1,1 g feine Nadelchen erhalten, welche bei ca. 120°–125° schmolzen und in Natronlauge $[\alpha]_D^{20} = +29^{\circ},3$ zeigten.

Beim Versetzen einer Lösung von 1,5 g *l*-Arabinose und der gleichen Menge *d*-Xylose in 10 ml Wasser mit 1,55 g Thiobenzhydrazid in 10 ml Alkohol entstand ein homogenes Gemisch, welches bis zum folgenden Tag 1,25 g *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid vom Schmp. 166°–168° und $[\alpha]_D^{20} = +51^{\circ},4$ (in Natronlauge wie oben) ausschied. Das Filtrat davon ergab mit 1,5 g Thiobenzhydrazid in 5 ml Alkohol eine Lösung, welche bis zum folgenden Tag nur eine Spur eines Kristallpulvers ausschied und dann bei der freiwilligen Eindunstung 2,6 g einer Kristallmasse lieferte, welche bei 120°–137° schmolz, 11,58, ber. 11,28, % S enthielt und wie oben $[\alpha]_D^{20} = +34^{\circ},0$ zeigte entsprechend der Zusammensetzung 34 % *l*-Arabinose- und 66 % *d*-Xylose-thiobenzhydrazid.

Nach Zusätzen von je *A* g *l*-Arabinose und *X* g *d*-Xylose zu Lösungen von 1,55 g Thiobenzhydrazid in 10 ml 1-n. Natronlauge und Stehenlassen während 24 Stunden wurden mit 10 ml 2-n. Essigsäure *g* g kristallinische Fällungen in den in der Tabelle 36 angegebenen Ausbeuten und mit den darin angeführten Eigenschaften erhalten.

Tabelle 36.

A	X	g	Schmp.	% S ¹	$[\alpha]_D^{20}$ ²	% A	% X
1,50	—	2,6	163°–165°	11,26	+51°,2	100	—
1,35	0,15	2,3	161°–163°	11,32	+49°,9	95	5
1,25	0,25	2,3	158°–160°	11,29	+49°,7	94	6
1,00	0,50	1,7	158°–160°	11,30	+48°,6	90	10
0,75	0,75	1,4 ³	153°–156°	11,20	+46°,6	82	18
0,50	1,00	2,2	113°–115° ⁴	11,25	+34°,6	36	64
0,25	1,25	2,1	113°–116°	11,30	+29°,2	16	84
0,15	1,35	2,1	115°–117°	11,26	+27°,0	7	93
—	1,50	2,2	116°–118°	11,33	+25°,1	—	100

Bei einem Versuch mit 1,5 g *l*-Arabinose und der gleichen Menge *d*-Xylose in 10 ml Wasser und 1,55 g Thiobenzhydrazid in 10 ml 1-n. Natronlauge ergab das Gemisch am folgenden Tag mit 10 ml 2-n. Essigsäure 1,3 g eines *l*-Arabinose-thiobenzhydrazids vom Schmp. 163°–165° (wie gew.), mit 11,22 % S und wie oben $[\alpha]_D^{20} = +50°,0$. Aus dem Filtrat wurden dann mit weiteren 1,5 g Thiobenzhydrazid in 5 ml Alkohol bis zum folgenden Tag noch 1,0 g desselben Thiohydrazids vom Schmp. 163°–165° mit 11,38 % S und $[\alpha]_D^{20} = +49°,5$ erhalten; das Filtrat davon lieferte bei der freiwilligen Eindunstung 2,4 g haarfeine Nadelchen vom Schmp. 115°–120°, mit 11,59 % S und von $[\alpha]_D^{20} = +27°,4$, entsprechend der Zusammensetzung 9 % *l*-Arabinose- und 91 % *d*-Xylose-thiobenzhydrazid.

Beim Versetzen einer Lösung von 0,3 g *l*-Arabinose und 1,2 g *d*-Xylose in 190 ml Wasser mit 1,55 g Thiobenzhydrazid in 10 ml 2-n. Salzsäure entstand ein opaleszierendes Gemisch, welches am folgenden Tag auch nach dem Filtrieren milchig war und dann bei 24-stündigem Durchleiten von Luft 0,55 g eines undeutlich kristallinen Pulvers vom Schmp. ca. 130°–170° ausschied. Bei der Behandlung dieses Pulvers mit 10 ml 0,5-n. Natronlauge verblieben 0,3 g unreines 5-*l*-Arabinotetraoxybutyl-2-phenyl-1,3,4-thiodiazol vom Schmp. 200°–203° ungelöst; als dieses aus 30 ml gew. Alkohol umkristallisiert wurde, ergab es 0,15 g haarfeine Nadeln vom Schmp. 211°–213° und mit:

Für $C_{12}H_{14}O_4N_2S$ (282,31):

ber.: C 51,05, H 5,00%; gef.: C 51,00, H 4,96 %.

Das Filtrat des ursprünglichen Oxydationsproduktes wurde mit 20 ml 1-n. Natronlauge versetzt, wonach es bei der freiwilligen Eindunstung 1,1 g einer auf Tonscherben getrockneten, teigigen Kristallmasse lieferte. Bei der Umkristallisation aus 5 ml gew. Alkohol wurden hieraus 0,6 g 5-*d*-Xylotetraoxybutyl-2-phenyl-1,3,4-thiodiazol

¹ Ber. 11,28 %.

² Schlüsseldrehungen in 10 Proz. überschüssiger Natronlauge bei $c = 5$.

³ Dann noch 0,7 g vom Schmp. 114°–116°, mit 11,30 % S und von $[\alpha]_D^{20} = +25°,3$, also aus fast reinem *d*-Xylose-thiobenzhydrazid bestehend. — Als bei einem zweiten Versuch ein Gemisch aus je 0,75 g *d*-Arabinose und *d*-Xylose in der gleichen Weise mit Thiobenzhydrazid umgesetzt wurde, wurden 2,25 g eines Produktes erhalten, welches nach Sinterung von ca. 116° an bei ca. 140°–146° unter Gasentwicklung schmolz, 11,28 % S enthielt und wie oben $[\alpha]_D^{20} = -19°,4$, entsprechend 58 % *d*-Arabinose und 42 % *d*-Xylose, zeigte.

⁴ Schmelze opak, dickflüssig, klar bei 142°.

als nadelförmige Prismen vom Schmp. 148° – 150° und mit

ber.: C 51,05, H 5,00%; gef.: C 51,08, H 4,93 %,

erhalten.

2. Versuche mit *l*-Arabinose und *d*-Lyxose

Beim Versetzen einer Lösung von 1,5 g *l*-Arabinose und der gleichen Menge *d*-Lyxose in 15 ml Wasser mit 3,1 g Thiobenzhydrazid in 15 ml Alkohol entstand ein homogenes Gemisch, welches bis zum folgenden Tag 5,0 g mit 10 ml 50 %-igem Alkohol gewaschenes Pulver und Bälle aus Nadelchen nebst dünnen, quadratförmigen Täfelchen vom Schmp. 152° – 154° (Schmelze blasig) ausschied.

Für $C_{12}H_{16}O_4N_2S$ (284,32):

ber.: N 9,85, S 11,28%; gef.: N 9,81, S 11,25 %.

In Pyridin wie gewöhnlich zeigte das Produkt $[\alpha]_D^{20} = -8^{\circ},6$, was dem Verhältnis 1:1 der Komponenten entspricht.

Das Filtrat des zuerst ausgeschiedenen Produktes ergab dann bei der freiwilligen Eindunstung 0,5 g Bälle aus Nadelchen vom Schmp. 148° – 150° und mit $[\alpha]_D^{20} = -19^{\circ},4$, entsprechend der Zusammensetzung 70 % *l*-Arabinose- + 30 % *d*-Lyxose-thiobenzhydrazid.

Von dem ersten Produkt wurden 4,2 g 1/4 Stunde mit 2 g Formalin, 20 ml Alkohol und 18 ml Wasser geschüttelt, wonach das Filtrat von einer Spur eines ungelösten Pulvers bald in einen Brei aus farblosen Nadelchen überging. Das am folgenden Tag abgesaugte, mit 10 ml 50 %-igem Alkohol gewaschene und an der Luft getrocknete Produkt wog 1,8 g, schmolz bei ca. 195° – 202° und zeigte (in Pyridin) $[\alpha]_D^{20} = +160^{\circ},7 \rightarrow +158^{\circ},6$. Beim Füllen mit Wasser aus seiner Lösung in Pyridin ergab es reines *d*-Lyxose-methylthiobenzhydrazid vom Schmp. 208° – 210° .

Für $C_{13}H_{16}O_4N_2S$ (296,34):

ber.: C 52,69, H 5,44, N 9,45, S 10,82 %,

gef.: C 52,67, H 5,40, N 9,36, S 10,72 %.

In Pyridin zeigte das gereinigte Produkt sofort und nach 300 Minuten $[\alpha]_D^{20} = +159^{\circ},7$.

Aus dem Filtrat des vorigen Rohproduktes wurden bei seiner freiwilligen Eindunstung zuerst noch 0,65 g *d*-Lyxose-methylthiobenzhydrazid vom Schmp. 195° – 202° , mit

ber.: N 9,45, S 10,82 %; gef.: N 9,58, S 10,69 %,

und (in Pyridin) von $[\alpha]_D^{20} = +161^{\circ},6 \rightarrow +156^{\circ},6$ gewonnen. — Das Filtrat hiervon ergab dann bei der fortgesetzten Eindunstung 2 g eines sirupösen Gummis, welches mit 1 g Thioglykolsäure in 10 ml Wasser ausgerührt wurde, wonach bald Kristallisation einsetzte und am folgenden Tag beim Absaugen und Waschen mit 10 ml Wasser 1,2 g einer Methylthiobenzhydrazino-*l*-arabinose-thioglykolsäure vom Schmp. 120° – 123° , mit 15,99, ber. 16,51, % S und in Pyridin von $[\alpha]_D^{20} = +389^{\circ} \rightarrow -16^{\circ},3$ und $C_M^{20} = 8,75 \times 10^{-4}$ erhalten wurden. Nach der Umkristallisation aus gew. Alkohol schmolz die Säure bei 129° – 131° , enthielt 16,60 % S und zeigte wie oben $[\alpha]_D^{20} = +531^{\circ} \rightarrow -34^{\circ},0$ und $C_M^{20} = 8,4 \times 10^{-4}$.

3. Versuche mit *l*-Arabinose und *l*-Rhamnose

Aus einer Lösung von 1,5 g *l*-Arabinose und 1,8 g *l*-Rhamnose in 18 ml Wasser und 3,1 g Thiobenzhydrazid in 20 ml Alkohol wurde ein klares Gemisch erhalten, welches bis zum folgenden Tag in einen Brei aus kleinen Kristallen überging. Dieser wurde 3 Stunden mit 2,0 g Formalin geschüttelt, wonach 2,5 g kurze Nadeln vom Schmp. ca. 195°–200° und mit 54,61 % C und 5,77 % H abgesaugt werden konnten. Beim Umkristallisieren von 2,3 g dieses Produktes aus 30 ml 50 %-igem Alkohol wurden 1,6 g *l*-Rhamnose-methylenthiobenzhydrazid als schmale Prismen vom Schmp. 202°–206° und (in Pyridin) von $[\alpha]_D^{20} = -152^{\circ},8$ erhalten.

Für $C_{14}H_{18}O_4N_2S$ (310,36):

ber.:	C 54,18,	H 5,85,	N 9,03,	S 10,33 %,
gef.:	C 54,73,	H 5,77,	N 9,49,	S 10,96 %.

Das Filtrat des Rohproduktes schied bei der freiwilligen Eindunstung noch 1,3 g Nadeln vom Schmp. ca. 140°–180° aus, und das Filtrat davon ergab mit 2 g Thio-glykolsäure ein klares Gemisch, welches bald zu kristallisieren begann und bis zum folgenden Tag 1,8 g Methylenthiobenzhydrazino-*l*-arabinose-thioglykolsäure als kleine Prismen vom Schmp. 128°–130° ausschied.

Für $C_{16}H_{20}O_6N_2S_2$ (388,45):

ber.:	C 46,38,	H 5,19,	N 7,21,	S 16,51 %,
gef.:	C 46,72,	H 4,98,	N 7,59,	S 16,50 %.

Von diesem Produkt ergaben 0,2058 g in Pyridin auf 10,04 ml gelöst 10 Minuten nach dem Zusatz des Lösungsmittels:

Tabelle 37.

<i>t</i>	α_D^{20}	$C_M^{20} \times 10^4$	<i>t</i>	α_D^{20}	$C_M^{20} \times 10^4$
0	+10°,15	—	660	+5°,53	8,4
5	+10°,10	—	1 370	+2°,87	8,1
10	+10°,06	—	2 070	+1°,37	8,0
70	+ 9°,54	8,3	4 230	–0°,28	—
140	+ 8°,94	8,5	10 120	–0°,68	—
300	+ 7°,70	8,6	11 420	–0°,68	—

$$[\alpha]_D^{20} = +500^{\circ} \rightarrow -33^{\circ},2 \text{ und } C_M^{20} = 8,3 \times 10^{-4}.$$

4. Versuch mit *d*-Xylose und *l*-Rhamnose

Aus 1,5 g *d*-Xylose und 1,8 g *l*-Rhamnose in 18 ml Wasser wurde mit 3,1 g Thiobenzhydrazid in 20 ml Alkohol ein homogenes Gemisch erhalten, welches bis zum folgenden Tag 2,7 g *l*-Rhamnose-thiobenzhydrazid als nadelförmige Prismen vom Schmp. 172°–174° und (in Pyridin) $[\alpha]_D^{20} = -10^{\circ},2$ ausschied.

Für $C_{13}H_{18}O_4N_2S$ (298,35):

ber.:	C 52,33,	H 6,08,	N 9,39,	S 10,75 %,
gef.:	C 52,43,	H 6,04,	N 9,44,	S 10,75 %.

Das Filtrat schied bei der freiwilligen Eindunstung bis zum folgenden Tag 2,8 g *d*-Xylose-thiobenzhydrazid als Nadelbälle vom Schmp. 107°–109° und (in Pyridin) $[\alpha]_D^{20} = -38^{\circ},6$ aus.

Für $C_{12}H_{16}O_4N_2S$ (284,33):

ber.: C 50,69,	H 5,67,	N 9,85,	S 11,28 %.
gef.: C 50,93,	H 5,68,	N 9,87,	S 11,23 %.

Das neue Filtrat ergab bei der fortgesetzten Eindunstung 0,75 g eines Restes, welcher beim Umkristallisieren aus wenig Alkohol noch 0,25 g *d*-Xylose-thiobenzhydrazid vom Schmp. 108°–110° und mit 50,59 % C und 5,67 % H lieferte.

5. Versuche mit *l*-Arabinose und *d*-Glucose

Aus 1,5 g *l*-Arabinose und 1,8 g *d*-Glucose in 10 ml Wasser und 1,55 g Thiobenzhydrazid in 10 ml Alkohol wurden bis zum nächsten Tag 2,3 g Nadelchen erhalten, welche bei 163°–165° schmolzen, 11,34, ber. 11,28, % S enthielten und in Natronlauge wie gewöhnlich $[\alpha]_D^{20} = +50^{\circ},2$ zeigten und somit aus fast reinem *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid bestanden. Das Filtrat davon ergab mit weiteren 1,55 g Thiobenzhydrazid in 5 ml Alkohol 2,3 g flache, schmale Prismen vom Schmp. 179°–181°, mit 10,22, ber. 10,31, % S und (in Natronlauge) von $[\alpha]_D^{20} = +22^{\circ},7$, was einem Gehalt von 10,4 % *l*-Arabinose- und 89,6 % *d*-Glucose-thiobenzhydrazid bzw. von 9,6 % *l*-Arabinose und 90,4 % *d*-Glucose entspricht.

Eine Lösung der Zucker in Wasser wie oben und 1,55 g Thiobenzhydrazid in 10 ml 1,1-n. Salzsäure schied im Laufe von 24 Stunden 0,5 g 5-*l*-Arabinotetraoxybutyl-2-phenyl-1,3,4-thiodiazol aus, welches bei 186°–200°, nach der Umkristallisation aus Alkohol bei 212°–213°, schmolzen und dann

ber.: C 51,05,	H 5,00 %;	gef.: C 51,02,	H 4,98 %,
----------------	-----------	----------------	-----------

enthielten. — Das Filtrat davon ergab mit 1,55 g Thiobenzhydrazid in 5 ml Alkohol bis zum folgenden Tag 2,3 g fast reines *d*-Glucose-thiobenzhydrazid vom Schmp. 176°–178°, mit 10,25, ber. 10,20, % S und (in Natronlauge) von $[\alpha]_D^{20} = +21^{\circ},6$. Das Filtrat dieser Fällung wurde von 2 g Natriumacetat in 3 ml Wasser emulgiert und schied dann eine Spur eines klebrigen Öls ab, wonach das Filtrat davon bei der freiwilligen Eindunstung 2 g unreines *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid lieferte, welches bei 150°–153° schmolz, 11,56, ber. 11,28, % S enthielt und sich nicht ganz klar in Natronlauge löste, sondern dabei etwas Thiodiazol-Derivat vom Schmp. 202°–204° zurückliess.

Beim Versetzen einer Lösung von 1,5 g *l*-Arabinose und 1,8 g *d*-Glucose in 15 ml Wasser mit 1,6 g Thiobenzhydrazid in 10,5 ml 1-n. Natronlauge entstand ein homogenes Gemisch, welches nach 12 Stunden mit 1 g Essigsäure angesäuert wurde, wonach bis zum folgenden Tag 2,25 g fast reines *l*-Arabinose-thiobenzhydrazid vom Schmp. 152°–155° und (in Natronlauge) von $[\alpha]_D^{20} = +48^{\circ},8$ ausgeschieden wurden. Beim Umkristallisieren von 1,0 g dieses Produktes aus 15 ml gew. Alkohol wurden 0,75 g reines Präparat vom Schmp. 166°–167° und (in Natronlauge) von $[\alpha]_D^{20} = +49^{\circ},5$ erhalten. — Die Mutterlauge des Rohproduktes ergab mit 1,6 g Thiobenzhydrazid in 6 ml 2-n. Salzsäure eine Emulsion, welche bald nadelförmige Prismen abzuschneiden begann und am nächsten Tag beim Absaugen, Waschen mit 10 ml Wasser und Trocknen an der Luft 3,1 g Thiobenzhydrazide vom Schmp. 176°–178°

und (in Natronlauge) von $[\alpha]_D^{20} = +24^{\circ},5$ lieferte. Diesem Drehungsvermögen entsprechen die Gehalte 15 % *l*-Arabinose und 85 % *d*-Glucose; als 2,3 g des Gemisches aus 200 ml gew. Alkohol umkristallisiert wurden, ergaben sie 1,5 g reines *d*-Glucose-thiobenzhydrazid als schmale und flache Prismen vom Schmp. 181° – 182° und (in Natronlauge) von $[\alpha]_D^{20} = +19^{\circ},2$.

Bei einem anderen Versuch wurden aus 1,5 g *l*-Arabinose und 1,8 g *d*-Glucose in der gleichen Weise mit 1,55 g Thiobenzhydrazid 2,55 g eines Produktes erhalten, welches bei 158° – 160° schmolz, 11,04, ber. 11,11, % S enthielt und (in Natronlauge) $[\alpha]_D^{20} = +46^{\circ},3$ zeigte, was einem Gehalt von 83 % *l*-Arabinose und 17 % *d*-Glucose entspricht. Das Filtrat davon lieferte mit der gleichen Menge Thiobenzhydrazid in 10 ml Alkohol bis zum folgenden Tag 2,0 g Kristallaggregate vom Schmp. 177° – 179° , mit 10,26, ber. 10,30, % S und (in Natronlauge) von $[\alpha]_D^{20} = +22^{\circ},4$, entsprechend 9 % *l*-Arabinose und 91 % *d*-Glucose.

Aus je *A* g *l*-Arabinose und *Gl* g *d*-Glucose wurden nach 2 Tagen mit je 1,55 g Thiobenzhydrazid in 10,2 ml 1-n. Natronlauge durch Fällungen mit 10 ml 2-n. Essigsäure die in der Tabelle 38 angegebenen Resultate erhalten.

Tabelle 38.

<i>A</i>	<i>Gl</i>	<i>g</i>	Schmp.	% S gef.	% S ber. ¹	$[\alpha]_D^{20}$	% <i>A</i>	% <i>Gl</i>
1,50	—	2,6	163° – 165°	11,26	11,28	$+51^{\circ},2$	100	—
1,20	0,36	2,4	154° – 156°	11,13	11,13	$+47^{\circ},0$	86	14
0,75	0,90	2,55	150° – 153°	10,61	10,76	$+36^{\circ},0$	50	50
0,30	1,44	2,6	160° – 163°	10,44	10,44	$+26^{\circ},4$	21	79
—	1,80	2,65	178° – 180°	10,16	10,20	$+19^{\circ},4$	—	100

6. Versuch mit *d*-Lyxose und *d*-Glucose

Beim Versetzen einer Lösung von 1,5 g *d*-Lyxose und 1,8 g *d*-Glucose in 15 ml Wasser mit 3,1 g Thiobenzhydrazid in 15 ml Alkohol setzte bald Kristallisation ein und am folgenden Tag wurden 5,1 g mit 10 ml 50 %-igem Alkohol gewaschene, dünne und flache Prismen oder schmale Täfelchen vom Schmp. 160° – 162° (Schmelze blasig) erhalten, welche der Analyse gemäss aus den Thiobenzhydraziden der beiden Zucker im Mol.-Verhältnis 1 : 1 bestanden:

Für $0,5 \text{ C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_4\text{N}_2\text{S} + 0,5 \text{ C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_5\text{N}_2\text{S}$ (299,35):

ber.: C 50,15, H 5,72, N 9,36, S 10,71 %,
gef.: C 50,36, H 5,65, N 9,34, S 10,75 %.

In Pyridin zeigte das Produkt $[\alpha]_D^{20} = -10^{\circ},3$, was der Zusammensetzung 52 Gew.-% *d*-Lyxose- + 48 Gew.-% *d*-Glucose-thiobenzhydrazid entspricht. — Bei der freiwilligen Eindunstung der Mutterlauge des obigen Produktes wurden weitere 0,75 g schmale Täfelchen gewonnen, welche bei 162° – 164° unter Zersetzung schmolzen und die folgende Zusammensetzung zeigten:

Für $0,4 \text{ C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_4\text{N}_2\text{S} + 0,6 \text{ C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_5\text{N}_2\text{S}$ (302,34):

ber.: C 50,05, H 5,73, N 9,27, S 10,60 %,
gef.: C 50,21, H 5,71, N 9,22, S 10,57 %.

¹ Aus den polarimetrisch ermittelten Gehalten an den beiden Thiobenzhydraziden.

Das Drehungsvermögen dieses Produktes (in Pyridin) betrug $[\alpha]_D^{20} = -19^\circ,8$, was die Zusammensetzung 36,5 Gew.-% *d*-Lyxose- + 63,5 Gew.-% *d*-Glucose-thiobenzhydrazid ergibt.

Von dem Hauptprodukt wurden 3,8 g eine halbe Stunde mit 1,5 g Formalin in einem Gemisch von 20 ml Alkohol und 18 ml Wasser geschüttelt, wonach das Filtrat von einer Spur eines ungelösten Pulvers nach der Impfung mit *d*-Lyxose-methylthiobenzhydrazid im Laufe von 5 Stunden 1,1 g mit 10 ml 50 %-igem Alkohol gewaschene, farblose Nadelchen vom Schmp. 201° – 203° ausschied. Eine Lösung von 0,5205 g dieses Produktes in Pyridin zu 10,00 ml zeigte 10 Minuten nach dem Zusatz des Lösungsmittels:

<i>t</i> :	0	10	60	180	310	1 400	3 000
α_D^{20} :	+7°,84	+7°,83	+7°,80	+7°,72	+7°,69	+7°,62	+7°,62.
$[\alpha]_D^{20} = +150^\circ,6 \rightarrow +146^\circ,4.$							

Nach Reinigung durch Ausfällen mit Wasser aus seiner Lösung in Pyridin bestand das Produkt aus reinem *d*-Lyxose-methylthiobenzhydrazid vom Schmp. 209° – 210° und nach 10, 140 und 360 Minuten von $[\alpha]_D^{20} = +159^\circ,8$ (in Pyridin).

Das Filtrat von dem zuerst erhaltenen *d*-Lyxose-methylthiobenzhydrazid ergab bei der freiwilligen Eindunstung zuerst 0,3 g Nadelchen vom Schmp. 201° – 203° und dann 1,1 g eines Produktes vom Schmp. 180° – 190° und (in Pyridin) von $[\alpha]_D^{20} = +48^\circ,6 \rightarrow +43^\circ,4$; ca. 66 % *d*-Lyxose- + 44 % *d*-Glucose-methylthiobenzhydrazid entsprechend. Bei der fortgesetzten Eindunstung, teilweise auf dem Wasserbad, wurden zum Schluss 0,6 g Nadelbälle erhalten, welche bei 173° – 177° schmolzen und (in Pyridin) $[\alpha]_D^{20} = -90^\circ,3 \rightarrow -93^\circ,3$ zeigten, entsprechend ca. 22 % *d*-Lyxose- + 78 % *d*-Glucose-methylthiobenzhydrazid. — Nach Zusammenreiben von 1,5 g reinen *d*-Lyxose-methylthiobenzhydrazids mit 1 g Thioglykolsäure lieferte das Gemisch am folgenden Tag beim Absaugen und Waschen mit 10 ml Wasser 1,1 g unverändertes Ausgangsmaterial vom Schmp. 208° – 210° ; als 2,5 g der obigen und zweier anderer, in der gleichen Weise erhaltenen Schlussfraktionen mit 2 g Thioglykolsäure in 10 ml Wasser behandelt wurden, verblieben 0,6 g eines fast reinen *d*-Lyxose-methylthiobenzhydrazids vom Schmp. 205° – 207° , mit

ber.: C 52,69, H 5,44 %; gef.: C 52,58, H 5,45 %,

und (in Pyridin) von $[\alpha]_D^{20} = +156^\circ,7 \rightarrow +153^\circ,6$ ungelöst.

7. Versuche mit *d*-Glucose und *d*-Mannose

Aus einer Lösung von 1,8 g *d*-Glucose und der gleichen Menge *d*-Mannose in 15 ml Wasser wurden mit 2 g Phenylhydrazin in 15 ml 2-n. Essigsäure 2,8 g *d*-Mannose-phenylhydrazon vom Schmp. 180° – 181° ausgefällt. Das Filtrat davon wurde mit 1,6 g Thiobenzhydrazid in 6 ml 2-n. Salzsäure versetzt, wonach am folgenden Tag 2,9 g *d*-Glucose-thiobenzhydrazid vom Schmp. 182° – 183° und (in Pyridin) $[\alpha]_D^{20} = -42^\circ,1$ abgenutscht werden konnten.

Nach dem Schütteln eines Gemisches aus 3 g *d*-Glucose- und 2 g *d*-Mannose-thiobenzhydrazid eine halbe Stunde lang mit 30 ml Pyridin wurden beim Absaugen und Waschen mit 10 ml Wasser 1,65 g des Mannose-thiobenzhydrazids vom Schmp. 190° – 191° und (in Pyridin) $[\alpha]_D^{20} = +16^\circ,5$ zurückgewonnen. Das Filtrat wurde mit

weiteren 90 ml Wasser versetzt, wonach es im Eisschrank bis zum folgenden Tag 0,8 g fast reines *d*-Glucose-thiobenzhydrazid vom Schmp. 179°–180° und (in Pyridin) $[\alpha]_D^{20} = -36^{\circ},4$ ausschied, während die Mutterlauge beim fortgesetzten Aufbewahren im Eisschrank noch 1,0 g Kristallpulver vom Schmp. 180°–181° und wie vorher von $[\alpha]_D^{20} = -35^{\circ},5$ ergab.

8. Versuche mit *d*-Glucose und *d*-Galaktose

Als eine Lösung von 1,8 g *d*-Galaktose in 10 ml Wasser mit 1,3 g α -Methylphenylhydrazin in 10 ml Alkohol versetzt wurde, schied das Gemisch bis zum folgenden Tag 0,75 g farblose Nadelchen vom Schmp. 175°–177° (Zersetzung) aus, und aus dem Filtrat fielen im Laufe von weiteren 5 Tagen noch 0,85 g Galaktose-methylphenylhydrazon von demselben Schmp. aus. — Aus einer Lösung von 1,8 g *d*-Glucose und der gleichen Menge *d*-Galaktose in 10 ml Wasser wurden dann mit 2,5 g Methylphenylhydrazin in 10 ml Alkohol zuerst 0,5 g und dann weiter 1,3 g *d*-Galaktose-methylphenylhydrazon vom Schmp. 177°–179° (Zersetzung) erhalten. Die Mutterlauge lieferte mit 2 g Thiobenzhydrazid in 10 ml Alkohol ein homogenes Gemisch, welches am folgenden Tag unverändert war, dann aber nach dem Zusatz von 10 ml 2-n. Salzsäure opaleszent wurde und bis zum nächsten Tag 2,4 g prismatische Nadelchen ausschied, welche bei 176°–178° (Zersetzung) schmolzen, 10,16, ber. 10,20, % S enthielten und in Natronlauge $[\alpha]_D^{20} = +20^{\circ},4$ zeigten, was der Zusammensetzung 90 % *d*-Glucose- und 10 % *d*-Galaktose-thiobenzhydrazid entspricht. Von diesem Produkt wurden 0,85 g in 25 ml warmem, 50 %-igem Alkohol gelöst, wonach die Lösung mit 4 ml 2-n. Eisenchlorid-Lösung versetzt wurde. Die hierbei entstandene, klare, gelbe Lösung schied beim Erkalten und bis zum folgenden Tag 0,4 g 5-*d*-Glucopentaoxyamyl-2-phenyl-1,3,4-thiodiazol als flache Prismen aus, welche bei 193°–195° schmolzen und in Pyridin $[\alpha]_D^{20} = -4^{\circ},8$ zeigten.

Aus 1,8 g *d*-Glucose und der gleichen Menge *d*-Galaktose in 10 ml Wasser und 1,55 g Thiobenzhydrazid in 10 ml Alkohol wurden bis zum folgenden Tag 2,75 g nadelförmige Prismen erhalten, welche bei 165°–167° schmolzen, 10,17, ber. 10,20, % S enthielten und (in Natronlauge) $[\alpha]_D^{20} = +27^{\circ},5$ zeigten, entsprechend 38 % *d*-Glucose und 62 % *d*-Galaktose. Das Filtrat davon lieferte mit derselben Menge Thiobenzhydrazid in 5 ml Alkohol 1,7 g Prismen vom Schmp. 179°–181°, mit 10,21, ber. 10,20, % S und (in Natronlauge) von $[\alpha]_D^{20} = +21^{\circ},8$, entsprechend 81 % *d*-Glucose und 19 % *d*-Galaktose. Das Filtrat der letzten Fällung ergab dann bei der freiwilligen Eindunstung noch 1,0 g nadelförmige Prismen vom Schmp. 167°–169°, mit 10,86 % S und (in Natronlauge) von $[\alpha]_D^{20} = +25^{\circ},3$, entsprechend der ungefähren Zusammensetzung 55 % *d*-Glucose und 45 % *d*-Galaktose.

Beim Versetzen einer Lösung von 1,8 g *d*-Glucose und der gleichen Menge *d*-Galaktose in 18 ml Wasser mit 3,1 g Thiobenzhydrazid in 20 ml Alkohol entstand ein homogenes Gemisch, welches bis zum folgenden Tag in einen Kristallbrei überging. Dieser wurde 4 Stunden mit 2 g Formalin geschüttelt, wonach das Filtrat von einer Spur eines äusserst feinkörnigen Pulvers bei der freiwilligen Eindunstung während einiger Tage 1,6 g *d*-Glucose-methylthiobenzhydrazid vom Schmp. 181°–183° ausschied. Dieses Produkt veränderte nicht sein Gewicht im Vakuum über Phosphorsäureanhydrid; eine Lösung davon in Pyridin zeigte nach 10 und 400 Minuten $[\alpha]_D^{20} = -160^{\circ},5$. Bei der weiteren Eindunstung der Mutterlauge bis zu 18 g

Gewicht wurden 0,9 g flache Nadeln und dann zum Schluss 3,5 g einer klebrigen Masse erhalten. Die Nadeln bestanden aus fast reinem *d*-Galaktose-methylenthio-benzhydrazid, denn sie schmolzen bei 139°–140°, verloren im Vakuum wie oben 4,94, ber. 5,23, % an Gewicht und enthielten dann:

Für $C_{14}H_{18}O_5N_2S$ (326,36):

ber.: C 51,52,	H 5,56,	N 8,58,	S 9,82 %,
gef.: C 51,51,	H 5,61,	N 8,50,	S 9,87 %.

Eine Lösung von 0,2620 g des getrockneten Produktes in Pyridin zu 10,04 ml zeigte 10 Minuten nach dem Zusatz des Pyridins:

<i>t</i> :	0	10	30	90	170	440	670	1 390
α_D^{20} :	+3°,84	+3°,82	+3°,78	+3°,67	+3°,55	+3°,45	+3°,42	+3°,42
	$[\alpha]_D^{20} = +151^\circ \rightarrow +131^\circ,1.$							

Aus 1,8 g *d*-Glucose und der gleichen Menge *d*-Galaktose in 10 ml Wasser wurden mit 1,55 g Thiobenzhydrazid in 10 ml 1,1-n. Salzsäure bis zum folgenden Tag 2,4 g eines feinkristallinen Pulvers erhalten, welches bei 171°–172° schmolz, 10,07, ber. 10,20, % S enthielt und (in Natronlauge) $[\alpha]_D^{20} = +25^\circ,5$ zeigte, entsprechend 53 % *d*-Glucose und 47 % *d*-Galaktose. Das Filtrat davon lieferte danach mit 1,55 g Thiobenzhydrazid in 5 ml Alkohol 3,0 g Prismen und Kristallbälle vom Schmp. 179°–181°, mit 10,29 % S und (in Natronlauge) von $[\alpha]_D^{20} = +21^\circ,4$, entsprechend 85 % *d*-Glucose und 15 % *d*-Galaktose.

Aus 1,8 g *d*-Glucose und der gleichen Menge *d*-Galaktose in 15 ml Wasser und 1,5 g Thiobenzhydrazid in 10 ml 2-n. Salzsäure wurde ein opaleszierendes Gemisch erhalten, welches bis zum folgenden Tag 2,1 g zusammengesinterte Kristallwarzen ausschied. Nach Pulverisierung wurde das Produkt mit 20 ml 0,5-n. Natronlauge geschüttelt, wonach das Filtrat von einer Spur eines ungelösten Pulvers mit 10 ml 2-n. Salzsäure 1,4 g Kristallbälle vom Schmp. 173°–175° und wie oben $[\alpha]_D^{20} = +25^\circ,1$, entsprechend 56 % *d*-Glucose- und 44 % *d*-Galaktose-thiobenzhydrazid, ausschied. — Das Filtrat des zuerst erhaltenen Produktes wurde mit 1,6 g Thiobenzhydrazid in 5 ml Alkohol versetzt, wonach es 3,4 g eines Kristallpulvers vom Schmp. 170°–172° ausschied. Nach der Behandlung mit 30 ml 0,5-n. Natronlauge usw. wie oben wurden hieraus 2,8 g einer kristallinen Fällung erhalten, welche bei 172°–174° schmolz und (in Natronlauge) $[\alpha]_D^{20} = +23^\circ,0$ zeigte, was der Zusammensetzung 72 % *d*-Glucose- und 28 % *d*-Galaktose-thiobenzhydrazid entspricht.

Aus 1,8 g *d*-Glucose und der gleichen Menge *d*-Galaktose in 18 ml Wasser und 3,1 g Thiobenzhydrazid in 12 ml 2-n. Salzsäure wurden bis zum folgenden Tag 5,2 g eines Kristallpulvers erhalten, welches eine Stunde lang mit 20 ml Alkohol, 18 ml Wasser und 1,8 g Formalin geschüttelt wurde. Das Filtrat von einer Spur eines ungelösten Pulvers schied dann bei der freiwilligen Eindunstung bis zum folgenden Tag 1,55 g farblose Nadeln vom Schmp. 180°–182° aus; aus der Mutterlauge wurden bei der fortgesetzten Eindunstung noch 0,6 g Kristalle vom Schmp. 181°–183° erhalten, wonach nichts kristallisierbares mehr erhalten werden konnte. Die beiden kristallinen Produkte wurden zusammen aus 50 ml gew. Alkohol und 10 ml Wasser umkristallisiert, wobei sie 1,6 g *d*-Glucose-methylenthio-benzhydrazid als flache Nadeln vom Schmp. 185°–187° und (in Pyridin) $[\alpha]_D^{20} = -166^\circ,3$ lieferten.

Aus 1,8 g *d*-Glucose und der gleichen Menge *d*-Galaktose in 10 ml Wasser wurde mit 1,55 g Thiobenzhydrazid in 10,1 ml 1-n. Natronlauge eine Lösung erhalten,

welche nach 2 Tagen mit 10 ml 2-n. Essigsäure versetzt wurde, wonach sie 2,65 g Kristallaggregate ausschied, welche bei 161°–163° schmolzen, 9,94, ber. 10,20, % S enthielten und (in Natronlauge) $[\alpha]_D^{20} = +27^{\circ},7$, entsprechend 36 % *d*-Glucose und 64 % *d*-Galaktose, zeigten. Das Filtrat davon ergab dann mit der gleichen Menge Thiobenzhydrazid in 10 ml Alkohol 2,5 g schmale Prismen vom Schmp. 168°–170°, mit 10,23 % S und (in Natronlauge) von $[\alpha]_D^{20} = +23^{\circ},6$, entsprechend der Zusammensetzung 68 % *d*-Glucose- und 32 % *d*-Galaktose.

Nach Umsetzungen von Gemischen aus *Gl* g *d*-Glucose und *Ga* g *d*-Galaktose mit Thiobenzhydrazid in Natronlauge usw. wie im vorigen Paragraphen wurden erhalten:

Tabelle 39.

<i>Gl</i>	<i>Ga</i>	g	Schmp.	% S ¹	$[\alpha]_D^{20}$	% <i>Gl</i>	% <i>Ga</i>
1,80	—	2,65	178°–180°	10,16	+19°,4	100	—
1,35	0,45	2,65	168°–170°	10,25	+23°,2	71	29
0,90	0,90	2,6	154°–157°	10,17	+26°,1	48	52
0,45	1,35	2,6	150°–152°	10,16	+28°,2	32	68
—	1,80	2,6	171°–173°	10,17	+32°,4	—	100

Eine Lösung von 2,2 g *d*-Glucose-thiobenzhydrazid und der gleichen Menge *d*-Galaktose-thiobenzhydrazid in 30 ml 0,5-n. Natronlauge ergab mit 3,0 ml 2-n. Salzsäure ein klares Gemisch, welches sich bald trübte und 1,2 g mit 5 ml Wasser gewaschenes Kristallpulver ausschied. Dieses schmolz bei 159°–161° und zeigte in Natronlauge wie gewöhnlich nach 1 und 2 Stunden $[\alpha]_D^{20} = +28^{\circ},2$, entsprechend der Zusammensetzung 24 % *d*-Glucose- und 76 % *d*-Galaktose-thiobenzhydrazid. Die Mutterlauge schied nach dem Zusatz von weiteren 2,0 ml 1-n. Salzsäure 1,4 g Kristallpulver vom Schmp. 168°–169° und wie oben von $[\alpha]_D^{20} = +23^{\circ},7$, entsprechend 63 % *d*-Glucose- und 37 % *d*-Galaktose-thiobenzhydrazid, aus.

Ein Versuch, die Glucose- und Galaktose-thiobenzhydrazide durch Fällung ihrer Lösung in Natronlauge mit Cadmiumsulfat-Lösung zu separieren, gelang nicht.

9. Versuche mit *d*-Glucose und *d*-Fructose

Beim Versetzen einer Lösung von je 1,1 g *d*-Glucose- und *d*-Fructose-thiobenzhydrazid in 14 ml 0,5-n. Natronlauge mit 14 ml 2-n. Essigsäure entstand eine kristalline Fällung von 1,9 g Gewicht, Schmp. 165°–166° und (in Pyridin) von $[\alpha]_D^{20} = -10^{\circ},6$, entsprechend der Zusammensetzung 51 % *d*-Glucose- und 49 % *d*-Fructose-thiobenzhydrazid. — Bei einem neuen Versuch wurde eine in der gleichen Weise bereitete Lösung mit 14 ml 2-n. Salzsäure versetzt, wonach nur 0,6 g Kristallpulver abgeschieden wurden. Dieses schmolz bei 175°–176° und zeigte (in Pyridin) $[\alpha]_D^{20} = -37^{\circ},6$, was der Zusammensetzung 90 % *d*-Glucose- und 10 % *d*-Fructose-thiobenzhydrazid entspricht. — Als zum Schluss eine Lösung von 2,2 g *d*-Glucose-thiobenzhydrazid und der gleichen Menge *d*-Fructose-thiobenzhydrazid in 30 ml 0,5-n. Natronlauge mit nur 4,0 ml 2-n. Salzsäure versetzt wurde, wog die entstandene Fällung 2,2 g; sie schmolz bei 167°–168°, während ihr Drehungsvermögen in Pyridin $[\alpha]_D^{20} = +12^{\circ},1$ betrug, was der Zusammensetzung 18 % *d*-Glucose- und 82 % *d*-

¹ Ber. 10,20 %.

Fructose-thiobenzhydrazid entspricht. Aus der Mutterlauge schieden dann 5 ml der Salzsäure 1,7 g *d*-Glucose-thiobenzhydrazid vom Schmp. 182°–183° und (in Pyridin) $[\alpha]_D^{20} = -42^{\circ},6$ aus.

Ein Gemisch aus 1,8 g *d*-Glucose und der gleichen Menge *d*-Fructose in 10 ml Wasser und 1,55 g Thiobenzhydrazid in 10 ml Alkohol schied bis zum folgenden Tag 2,1 g fast reines *d*-Glucose-thiobenzhydrazid vom Schmp. 178°–180°, mit 10,21, ber. 10,20, % S und von $[\alpha]_D^{20} = -40^{\circ},4$ (in Pyridin) aus. Das Filtrat ergab mit weiteren 1,55 g des Thiobenzhydrazids in 5 ml Alkohol in derselben Weise 1,9 g Thiobenzhydrazide vom Schmp. 165°–167°, mit 10,17, ber. 10,20, % S und (in Pyridin) von $[\alpha]_D^{20} = -0^{\circ},6$, entsprechend der Zusammensetzung 37 % *d*-Glucose- und 63 % *d*-Fructose-thiobenzhydrazid.

Nach Versetzen einer Lösung von 1,8 g *d*-Glucose und der gleichen Menge *d*-Fructose in 18 ml Wasser mit 3,1 g Thiobenzhydrazid in 12 ml 2-n. Salzsäure wurden bis zum folgenden Tag 3,3 g nadelförmige Prismen vom Schmp. 170°–173° ausgeschieden. In Pyridin zeigte das Produkt $[\alpha]_D^{20} = -34^{\circ},2$; und als 2,6 g davon aus 150 ml gew. Alkohol umkristallisiert wurden, schied die Lösung beim Erkalten 1,8 g *d*-Glucose-thiobenzhydrazid als Nadeln vom Schmp. 183°–184° und (in Pyridin) $[\alpha]_D^{20} = -42^{\circ},4$ aus. Die Verarbeitung der Mutterlauge des Rohproduktes ergab nichts Einheitliches.

Eine Lösung aus je 1,8 g *d*-Glucose und *d*-Fructose in 10 ml Wasser lieferte bis zum folgenden Tag mit 1,55 g Thiobenzhydrazid in 10 ml 1,1-n. Salzsäure 2,9 g Kristallaggregate vom Schmp. 180°–182°, mit 10,31, ber. 10,20, % S und (in Pyridin) von $[\alpha]_D^{20} = -37^{\circ},2$, entsprechend der Zusammensetzung 95 % *d*-Glucose- und 5 % *d*-Fructose-thiobenzhydrazid. Das Filtrat ergab dann mit 1,55 g Thiobenzhydrazid in 5 ml Alkohol bis zum folgenden Tag 2,5 g Kristallwarzen vom Schmp. 164°–166°, mit 10,27 % S und (in Pyridin) von $[\alpha]_D^{20} = +18^{\circ},3$, woraus sich die Zusammensetzung 9 % *d*-Glucose- und 91 % *d*-Fructose-thiobenzhydrazid ergibt.

Als eine Lösung von 6,9 g Rohrzucker in 20 ml 0,2-n. Salzsäure nach 5 Tagen bei gewöhnlicher Temperatur mit 3,05 g Thiobenzhydrazid in 15 ml 1-n. Salzsäure versetzt wurde, schied das Gemisch bis zum folgenden Tag 5,65 g fast reines *d*-Glucose-thiobenzhydrazid vom Schmp. 181°–182° und (in Pyridin) $[\alpha]_D^{20} = -41^{\circ},0$ aus. Das Filtrat ergab mit 3,05 g Thiobenzhydrazid eine Lösung, welche am nächsten Tag 5,3 g Thiobenzhydrazide vom Schmp. 171°–172° und (in Pyridin) $[\alpha]_D^{20} = +19^{\circ},9$, entsprechend 7 % *d*-Glucose- und 93 % *d*-Fructose-thiobenzhydrazid, abgesetzt hatte.

Eine mit 1,5 g Thiobenzhydrazid in 10 ml 1-n. Natronlauge versetzte Lösung von 1,8 g *d*-Glucose und der gleichen Menge *d*-Fructose in 30 ml Wasser wurde nach 3 Tagen mit 5 ml 2-n. Salzsäure versetzt, wonach bis zum folgenden Tag 1,85 g mit 10 ml Wasser gewaschenes *d*-Glucose-thiobenzhydrazid als ein Kristallpulver vom Schmp. 180°–181° und (in Pyridin) $[\alpha]_D^{20} = -39^{\circ},8$ ausgeschieden wurden. Das Filtrat ergab mit 2 g Thiobenzhydrazid in 10 ml 2-n. Salzsäure ein opaleszierendes Gemisch, welches nach 2 Tagen 1,2 g eines Kristallpulvers vom Schmp. ca. 168°–170° und (in Pyridin) $[\alpha]_D^{20} = -29^{\circ},2$ ausgeschieden hatte. Das Filtrat davon ergab bei der freiwilligen Eindunstung 2,0 g Kristallpulver vom Schmp. ca. 160°–162° und wie oben von $[\alpha]_D^{20} = +16^{\circ},6$. Beim Umkristallisieren aus gew. Alkohol lieferte dieses Produkt ein *d*-Fructose-thiobenzhydrazid vom Schmp. 170°–171°, (in Pyridin) $[\alpha]_D^{20} = +21^{\circ},4$ und mit 9,56, ber. 10,20, % S.

Aus einem Gemisch von 1,8 g *d*-Glucose und der gleichen Menge *d*-Fructose in 10 ml Wasser mit 1,55 g Thiobenzhydrazid in 10,2 ml 1-n. Natronlauge wurden nach 2 Tagen mit 10 ml 2-n. Essigsäure 3,0 g einer kristallinen Fällung erhalten,

welche bei 157°–159° schmolz, 10,32 % S enthielt und (in Pyridin) $[\alpha]_D^{20} = -18^\circ,0$ zeigte, entsprechend 65 % *d*-Glucose- und 35 % *d*-Fructose-thiobenzhydrazid. Das Filtrat ergab mit 1,55 g Thiobenzhydrazid in 10 ml Alkohol ein homogenes Gemisch, welches bis zum folgenden Tag 0,6 g nadelförmige Prismen ausschied. Diese schmolzen bei 180°–182°, enthielten 10,55 % S und zeigten (in Pyridin) $[\alpha]_D^{20} = -37^\circ,1$, was der Zusammensetzung ca. 95 % *d*-Glucose- und 5 % *d*-Fructose-thiobenzhydrazid entspricht. Das neue Filtrat schied dann bei der freiwilligen Eindunstung bis auf 23 g Gewicht 1,8 g Kristallaggregate aus, welche bei 159°–161° schmolzen, 10,35 % S enthielten und (in Pyridin) $[\alpha]_D^{20} = +14^\circ,7$ zeigten, was der Zusammensetzung 15 % *d*-Glucose- und 85 % *d*-Fructose-thiobenzhydrazid entspricht.

Aus je *Gl* g *d*-Glucose und *F* g *d*-Fructose wurden mit 1,55 g Thiobenzhydrazid in 10 ml 1,1-n. Salzsäure nach 24 Stunden die in der Tabelle 40 angegebenen Resultate erhalten.

Tabelle 40.

<i>Gl</i>	<i>F</i>	<i>g</i>	Schmp.	% S ¹	$[\alpha]_D^{20}$ ²	% <i>Gl</i>	% <i>F</i>
1,80	—	3,0	181°–183°	10,28	$-40^\circ,4$	100	—
1,35	0,45	2,4	172°–174°	10,39	$-37^\circ,8$	96	4
1,20	0,60	2,3	170°–172°	10,21	$-33^\circ,1$	89	11
0,90	0,90	2,8	163°–165°	10,38	$-10^\circ,1$	53	47
0,80	1,00	2,75	163°–165°	10,28	$-7^\circ,8$	50	50
0,45	1,35	2,75	160°–162°	10,36	$+9^\circ,0$	24	76
0,35	1,45	2,75	164°–166°	10,35	$+12^\circ,2$	19	81
—	1,80	2,95	171°–172°	10,28	$+24^\circ,4$	—	100

10. Versuche mit *d*-Galaktose und *d*-Fructose

Beim Schütteln von 2,2 g *d*-Galaktose- und der gleichen Menge *d*-Fructose-thiobenzhydrazid mit 30 ml 0,5-n. Natronlauge entstand eine Lösung, welche mit 3,0 ml 2-n. Salzsäure 1,2 g Kristallpulver lieferte. Dieses schmolz bei 164°–165° und zeigte (in Pyridin) $[\alpha]_D^{20} = +19^\circ,2$, was der Zusammensetzung 8 % *d*-Galaktose- und 92 % *d*-Fructose-thiobenzhydrazid entspricht. Das Filtrat ergab mit 2,0 ml derselben Säure 1,3 g Kristallpulver vom Schmp. 166°–167° und (in Pyridin) $[\alpha]_D^{20} = -27^\circ,0$, entsprechend 82 % *d*-Galaktose- und 18 % *d*-Fructose-thiobenzhydrazid. Aus dem letzten Filtrat wurden zum Schluss mit mehr Salzsäure noch 0,7 g eines Kristallpulvers erhalten, welches bei 170°–172° schmolz und (in Pyridin) $[\alpha]_D^{20} = -29^\circ,3$ zeigte, was einer Zusammensetzung von 86 % des *d*-Galaktose- und 14 % des *d*-Fructose-thiobenzhydrazids entspricht.

Als eine Lösung von je 1,8 g *d*-Galaktose und *d*-Fructose in 10 ml Wasser mit 1,55 g Thiobenzhydrazid in 10 ml Alkohol versetzt wurde, schied das Gemisch bis zum folgenden Tag 2,4 g nadelförmige Prismen aus, welche bei 174°–176° schmolzen, 10,17, ber. 10,20, % S enthielten und (in Pyridin) $[\alpha]_D^{20} = -38^\circ,0$ zeigten, also nur aus *d*-Galaktose-thiobenzhydrazid bestanden. Nach Zusatz von weiteren 1,55 g Thiobenzhydrazid in 5 ml Alkohol schied das Filtrat bei der freiwilligen Eindunstung

¹ Ber. 10,20 %.² In Pyridin bei *c* = 5.

2,2 g zu dichten Bällen vereinigten, schmalen Prismen aus, welche den Schmp. 163° – 165° zeigten, 10,31 % S enthielten und (in Pyridin) $[\alpha]_D^{20} = +15,4$ ergaben, was der Zusammensetzung 14 % *d*-Galaktose- und 86 % *d*-Fructose-thiobenzhydrazid entspricht.

Eine Lösung von 1,20 g *d*-Galaktose und 0,60 g *d*-Fructose in 10 ml Wasser lieferte mit 1,55 g Thiobenzhydrazid in 10 ml Alkohol bis zum folgenden Tag 1,7 g mit 5 ml 50 %-igem Alkohol gewaschene Aggregate aus flachen Prismen, welche bei 175° – 177° schmolzen, 10,03, ber. 10,20, % S enthielten und (in Pyridin) $[\alpha]_D^{20} = -37,1$ zeigten und somit aus fast reinem *d*-Galaktose-thiobenzhydrazid bestanden. Das Filtrat davon schied dann bei freiwilliger Eindunstung 0,9 g Kristallpulver vom Schmp. 156° – 158° aus, welches 10,83 % S enthielt und (in Pyridin) $[\alpha]_D^{20} = +6,5$ zeigte, entsprechend der Zusammensetzung ca. 30 % *d*-Galaktose- und 70 % *d*-Fructose-thiobenzhydrazid. — Aus je 0,90 g der beiden Zucker wurden in der gleichen Weise zuerst 1,1 g Kristallaggregate erhalten, welche bei 173° – 175° schmolzen, 10,01 % S enthielten und (in Pyridin) $[\alpha]_D^{20} = -36,3$ zeigten, entsprechend der Zusammensetzung 97 % *d*-Galaktose- und 3 % *d*-Fructose-thiobenzhydrazid. Aus dem Filtrat davon wurden dann bei der freiwilligen Eindunstung noch 1,0 g nadel-förmige Prismen erhalten, welche bei 157° – 159° schmolzen, 10,35 % S enthielten und (in Pyridin) $[\alpha]_D^{20} = +15,5$ zeigten, was der Zusammensetzung 14 % *d*-Galaktose und 86 % *d*-Fructose entspricht. — Schliesslich ergab ein Gemisch aus 0,60 g *d*-Galaktose und 1,20 g *d*-Fructose wie oben zuerst 0,8 g Kristallwarzen vom Schmp. 171° – 174° , mit 10,18 % S und von $[\alpha]_D^{20} = -32,8$, was 92 % *d*-Galaktose und 8 % *d*-Fructose entspricht. Aus dem Filtrat wurden dann wie oben 1,4 g schmale Prismen erhalten, welche bei 159° – 161° schmolzen, 10,23 % S enthielten und (in Pyridin) $[\alpha]_D^{20} = +10,6$ zeigten, entsprechend 22 % *d*-Galaktose- und 78 % *d*-Fructose-thiobenzhydrazid.

Aus einem Gemisch von je 1,8 g *d*-Galaktose und *d*-Fructose in 10 ml Wasser und 1,55 g Thiobenzhydrazid in 10 ml 1,1-n. Salzsäure wurden bis zum folgenden Tag 2,8 g feinkristallines Pulver erhalten, welches bei 170° – 172° schmolz, 10,17 % S enthielt und (in Pyridin) $[\alpha]_D^{20} = -33,7$ zeigte, entsprechend 93 % *d*-Galaktose- und 7 % *d*-Fructose-thiobenzhydrazid. Aus dem Filtrat wurden nach Zusatz von weiteren 1,55 g Thiobenzhydrazid und bei freiwilliger Eindunstung 2,7 g Kristallwarzen erhalten, welche bei 167° – 169° schmolzen, 10,29 % S enthielten und (in Pyridin) $[\alpha]_D^{20} = +22,3$ zeigten, was einem Gehalt von 3 % *d*-Galaktose und 97 % *d*-Fructose entspricht.

Eine Lösung von 1,8 g *d*-Galaktose und der gleichen Menge *d*-Fructose in 15 ml Wasser wurde mit 1,6 g Thiobenzhydrazid in 10 ml 2-n. Salzsäure versetzt, wonach das Gemisch bis zum folgenden Tag 3,0 g eines Kristallpulvers ausschied, welches bei 163° – 165° schmolz und (in Pyridin) $[\alpha]_D^{20} = -34,3$ zeigte und also aus 94 % *d*-Galaktose- und 6 % *d*-Fructose-thiobenzhydrazid bestand. Das Filtrat wurde mit 1,6 g Thiobenzhydrazid in 5 ml Alkohol versetzt und schied dann allmählich 2,7 g Kristallwarzen aus, welche bei 170° – 172° schmolzen und (in Pyridin) $[\alpha]_D^{20} = +21,2$ zeigten, was einem Gemisch von 5 % *d*-Galaktose- und 95 % *d*-Fructose-thiobenzhydrazid entspricht.

Nach dem Versetzen einer Lösung von 1,8 g *d*-Galaktose und der gleichen Menge *d*-Fructose in 10 ml Wasser mit 1,55 g Thiobenzhydrazid in 10 ml 1-n. Natronlauge und am folgenden Tag Zusatz von 10 ml 2-n. Essigsäure zum Filtrat von einer Spur einer schlammartigen Ausscheidung entstand eine opaleszierende Lösung, welche bis zum nächsten Tag 2,65 g Kristallwarzen ausschied. Diese schmolzen

bei 167°–169°, enthielten 10,16, ber. 10,20, % S und zeigten (in Pyridin) $[\alpha]_D^{20} = -33^\circ,3$, entsprechend 92 % *d*-Galaktose- und 8 % *d*-Fructose-thiobenzhydrazid. Das Filtrat davon lieferte mit 1,55 g Thiobenzhydrazid in 10 ml Alkohol eine Lösung, welche am folgenden Tag fast unverändert war und dann bei der freiwilligen Eindunstung 2,0 g schmale Prismen ausschied. Diese schmolzen bei 159°–161°, enthielten 10,29 % S und zeigten (in Pyridin) $[\alpha]_D^{20} = +13^\circ,2$, entsprechend der Zusammensetzung 18 % *d*-Galaktose- und 82 % *d*-Fructose-thiobenzhydrazid.

Aus je *Ga* g *d*-Galaktose und *F* g *d*-Fructose wurden mit 1,55 g Thiobenzhydrazid in 10 ml 1,1-n. Salzsäure nach 24 Stunden die in der Tabelle 41 angegebenen Resultate erhalten:

Tabelle 41.

<i>Ga</i>	<i>F</i>	<i>g</i>	Schmp.	% S ¹	$[\alpha]_D^{20\ 2}$	% <i>Ga</i>	% <i>F</i>
1,80	—	2,9	172°–174°	10,17	–37°,0	100	—
1,35	0,45	2,2	170°–172°	10,25	–33°,1	94	6
1,20	0,60	2,0	167°–169°	10,21	–31°,8	91	9
0,90	0,90	2,6	162°–164°	10,24	–6°,6	50	50
0,45	1,35	2,75	162°–164°	10,22	+9°,7	24	76
0,30	1,50	2,8	164°–166°	10,33	+16°,1	13,5	86,5
—	1,80	2,95	171°–172°	10,28	+24°,4	—	100

LITERATURVERZEICHNIS: 1. **B. Holmberg**: Arkiv f. kemi, mineral. o. geol. 17 A. N:o 23 (1944). — 2. —: Ibid. 25 A. N:o 18 (1947). — 3. **H. Wuyts**: C. R. 196, 1678 (1933), und spätere Mitteilungen in Bull. Soc. Chim. de Belg. — 4. **G. Young** and **W. Eyre**: Journ. Chem. Soc. London 79, 54 (1901). — 5. **E. Fromm**: A. 447, 259 (1921). — 6. **E. Hoggarth**: Journ. Chem. Soc. London 1949, S. 1164. — 7. **A. Fredga**: Arkiv f. kemi, mineral. o. geol. 14 B. N:o 12 (1940). — 8. **B. Holmberg**: Svensk Papperst. 50, 111 (1947). — 9. —: Arkiv f. kemi, mineral. o. geol. 26 B. N:o 15 (1948). — 10. **A. Johansson**: Arkiv f. kemi 4, nr 4 (1952). — 11. **J. Wangel**: Arkiv f. kemi 1, 431 (1949). — 12. **H. Wuyts** et **A. Lacourt**: Bull. Soc. Chim. de Belg. 45, 685 (1936). — 13. **L. Ramberg**: A. 370, 234 (1909). — 14. **A. Bernton**: Diss. Lund 1932, S. 103. — 15. —: Ibid., S. 21. — 16. **A. Nordal**: A Pharmacognostical Study of Sedum acre L., Oslo 1946, S. 82. — 17. **K. H. Böddener** und **B. Tollens**: B. 43, 1648 (1910). — 18. **K. Rehorst**: B. 63, 2288 (1930). — 19. **S. Moore** and **K. P. Link**: Journ. Biol. Chem. 133, 293 (1940).

Org.-chem. Abteilung des Nobelinstituts der Kgl. Akademie der Wissenschaften, Stockholm.

¹ Ber. 10,20 %.² In Pyridin für $c = 5$.

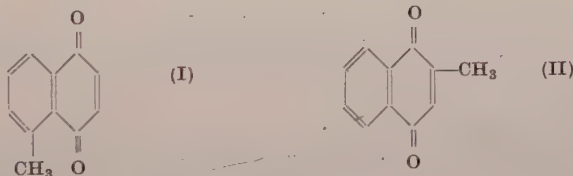
5-Methyl-1,4-naphthaquinone. Synthesis and ultra violet absorption spectrum

By GERD BENDZ

With 1 figure in the text

In connection with the isolation and identification of the fungus pigment 6-methyl-1,4-naphthaquinone (1) an investigation of the isomeric 5-methyl-naphthaquinone was begun in order to compare the biological properties of these two quinones with those of the well known 2-methyl-naphthaquinone.

Two different naphthaquinones with a methyl group in the α -position of the benzene ring are described in the relevant literature. One of these is called 1-methyl-5,8-naphthaquinone, but if we change the numbering, it is evident that it can also be called 5-methyl-1,4-naphthaquinone (I). This quinone was synthesized from 1-methyl-5,8-naphthalenediamin, which on oxidation gave a yellow quinone m.p. 121–122° C (2). As this compound has been obtained from both 1-methyl-5-nitro-naphthalene and 1-methyl-8-nitro-naphthalene, the α -position of the methyl group seems fairly well established, and the oxidation product obtained is most likely to be 5-methyl-1,4-naphthaquinone. This conclusion is further confirmed by the present investigation.

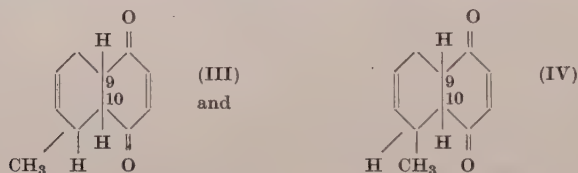


The other quinone was obtained by HERZENBERG and RUHEMANN (3) in a yield of 20 % on oxidizing α -methyl-naphthalene with chromic acid. They describe it as yellow needles, m.p. 102–103° C, and prove the 5-position of the methyl group by degradation to hemimellitic acid. The quinone synthesized in this way from commercial α -methyl-naphthalene turned out, however, to be identical with 2-methyl-naphthaquinone (II). In order to find out why this quinone appeared, the commercial product was carefully purified (4) and the α -methyl-naphthalene obtained was then oxidized as before with chromic acid. 2 % of a new quinone was obtained which, after crystallization, melted at 121–122° C. Hence the formation of the 2-methyl-isomeride on oxidizing commercial α -methyl-naphthalene can only be explained on the grounds that it is contaminated with β -methyl-naphthalene,

and this explanation has been confirmed by the results of the ultra violet absorption analysis of the commercial product carried out according to the method given by COGGESHALL and GLESSNER (5), the α -methyl-naphthalene analyzed contained at least 14 % β -methyl-isomeride. Considering the small yield of 5-methyl-naphthaquinone obtained on oxidizing purified α -methyl-naphthalene and the fact that a substituted benzene ring is more easily attacked by an oxidizing agent than an unsubstituted ring, this concentration of β -methyl-naphthalene in the α -compound may well explain the formation of 2-methyl-naphthaquinone, the β -isomeride being completely oxidized to the corresponding quinone, which might be contaminated with an insignificant quantity of the 5-methyl-quinone.

The α -methyl-naphthalene used by HERZENBERG and RUHEMANN (3) must have been a mixture of α - and β -compounds — the latter probably predominating — as the corresponding picrate melted at 116° C, the m.p. of β -methyl-naphthalene picrate being 117.5° C and that of the α -isomeride 141–142° C.

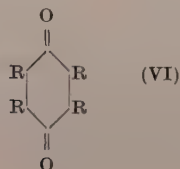
In order to confirm, that the quinone obtained on oxidation of purified α -methyl-naphthalene is identical with 5-methyl-naphthaquinone, this compound was synthesized. Diene condensation of piperylene and p-benzoquinone yielded an oily product of "piperylene-quinone" which is probably a mixture of the two steric isomerides:



which are differentiated by the cis or trans position of the methyl group with regard to the two hydrogen atoms in the 9 and 10 positions. The cis position of these two hydrogen atoms is established by the rule given by ALDER and STEIN (6). It has not been possible to isolate either of these isomerides from the oily mixture owing to its easy isomerization to 5-methyl-5,8-dihydro-naphthaquinone; the isomerization occurs, if the condensation product is just warmed. On oxidation of this hydroquinone, a yellow quinone was obtained which, after crystallization, melted at 121–122° C and which was identical with the quinone from purified α -methyl-naphthalene.

The 5-methyl-1,4-naphthaquinone is active against *Staphylococcus aureus*.

Fig. 1 shows the ultra violet absorption spectra of 1,4-naphthaquinone and its three methylated derivatives. According to MORTON, EARLAM (7), and others, the spectra of 1,4-naphthaquinone and its alkyl substitution products are accounted for by summation of effects due to



$\lambda_{\max}$ 2620, 2720 Å quinonoid
 $\lambda_{\max}$ ca. 4000 Å carbonyl

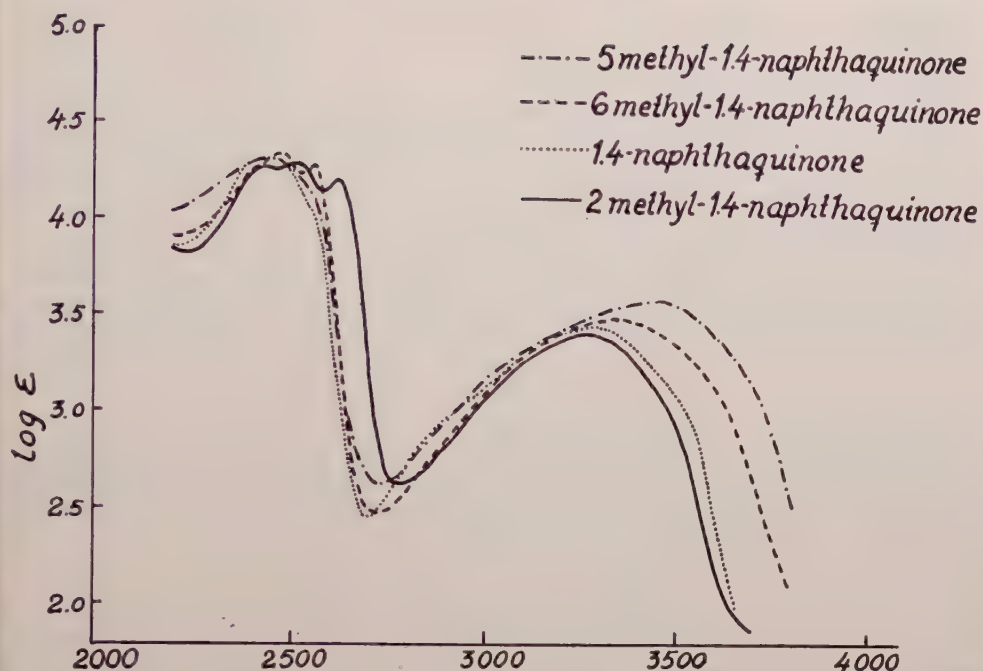


Fig. 1.

This interpretation is supported by the four curves in fig. 1. A substitution in the benzenoid ring affects only the chromophore V, whereas the introduction of a methyl group into the quinonoid ring produces a marked influence on the quinonoid absorption.

Experimental

Oxidation and purification of α -methyl-naphthalene. α -Methyl-naphthalene (Scheering-Kahlbaum A. G.), picrate m.p. $136\text{--}140^\circ\text{C}$, was oxidized in accordance with the directions given by HERZENBERG and RUHEMANN (3) and a yield of about 10 % of a yellow quinone, m.p. $74\text{--}86^\circ\text{C}$, was obtained. After repeated recrystallizations from cyclohexane it melted at $103\text{--}104^\circ\text{C}$. On admixture with 2-methyl-naphthaquinone there was no depression of the melting point, and the absorption spectrum measured in 2,2,4-trimethylpentane was identical with that of 2-methyl-quinone. In order to purify the commercial product it was converted to 1-methyl-naphthalene-4-sulphonic acid (4), which was recrystallized several times from dilute sulphuric acid, desulphonated and distilled under reduced pressure, the fraction boiling at $104.5\text{--}104.7^\circ\text{C}/9\text{ mm}$ was collected, the picrate having m.p. $140\text{--}141^\circ\text{C}$. On oxidation with chromic acid this fraction gave about 2 % of a quinone melting at $116\text{--}120^\circ\text{C}$ which, after several recrystallizations from cyclohexane, melted at $121\text{--}122^\circ\text{C}$.

In order to estimate the β -methyl-naphthalene content of the commercial product, the absorption spectrum of this compound and those of the purified α - and β -methyl-naphthalenes were measured in a Beckman spectrophotometer in 2,2,4-

trimethylpentane. The calculations were carried out in accordance with the instructions of COGGESHALL and GLESSNER (5) and gave a value of 14 % β -isomeride in the commercial α -methyl-naphthalene.

Synthesis of 5-methyl-naphthaquinone. Piperylene was prepared from crotonaldehyde and methyl iodide according to the method given by MULLIKEN, WAKEMAN and GERRY (8). Carefully purified *p*-benzoquinone (4 g.) and piperylene (3 g.) were refluxed on the steam bath at 70–75° C, until all *p*-benzoquinone was dissolved. The surplus piperylene was removed under reduced pressure, and a yellow oil was left. This was further purified by repeated extractions with petroleum ether which gave a bright yellow, oily product on evaporation. Attempts to purify the oil by distillation in a high vacuum failed; the oil solidified when warmed, and the product formed, recrystallized several times from dilute methanol and carbon tetrachloride, turned out to be isomerized "piperylene-quinone", viz., 5-methyl-5,8-dihydro-naphthahydroquinone.

The condensation product also isomerized, if a drop of concentrated hydrochloric acid was added to an alcoholic solution of the oil. Heat was evolved, and on adding water a precipitate was formed which, after recrystallization from dilute methanol and carbon tetrachloride, yielded small colourless needles melting at 144–145° C.

$C_{11}H_{12}O_2$	Calc.	C 74.97	H 6.87
	Found	C 74.76	H 6.81

In order to establish the hydroquinone structure of this compound the diacetate was synthesized. The hydroquinone was boiled for three hours with acetic anhydride, water was added and a colourless precipitate formed slowly, which, after crystallization from dilute methanol yielded thin, colourless leaflets m.p. 71–72° C.

$C_{15}H_{16}O_4$	Calc.	C 69.21	H 6.20
	Found	C 69.06	H 6.11

In order to hydrolyse the diacetate, it was treated with alcoholic potassium hydroxide. On acidification a colourless precipitate formed which, after crystallization, gave needles m.p. and mixed m.p. with the hydroquinone 144–145° C.

The oxidation of 5-methyl-5,8-dihydro-naphthahydroquinone was performed in acetic acid first with sodium nitrite and then with sodium dichromate in accordance with the method described by FIESER (9) for 1,4-naphthaquinone. After recrystallization from cyclohexane and dilute acetic acid the quinone was obtained as yellow needles, m.p. 121–122° C. On admixture with the quinone formed on oxidation of purified α -methyl-naphthaquinone the melting point was not depressed.

$C_{11}H_8O_2$	Calc.	C 76.73	H 4.68
	Found	C 76.62	H 4.80

Diene condensation of piperylene and *p*-benzoquinone has also been tried in nitrobenzene in a sealed glass tube at 130–140° C by ARBUZOV and SPEKTERMAN (10). They obtained a colourless compound, m.p. 159–160° C, which they called 1-methyl-1,4,9,10-tetrahydro-naphthaquinone. This name indicates that the product should be the mono-adduct, viz., "piperylene-quinone". As this is not the case, it might be that the substance is a di-adduct, a similar compound being formed in a small yield, when the Diene condensation was performed in benzene at 90–100° C during

9 hours. The substance which was not further investigated, crystallized from alcohol in long, colourless needles m.p. 156–157° C.

Ultra violet absorption measurements. The absorption spectra of the four quinones (fig. 1) were measured in a Beckman spectrophotometer, the solvent being 2,2,4-trimethylpentane. 5-Methyl-naphthaquinone exhibits the following maxima and $\log \epsilon$ values.

$\lambda_{\max}$.	2460 Å	$\log \epsilon$	4.34
	3450 Å		3.58

This investigation has received financial support from the *Swedish Natural Science Research Council* which is gratefully acknowledged. My thanks are also due to Mr. R. ÖHBERG for technical assistance.

Chemical Institute, University of Uppsala.

REFERENCES: 1. Bendz, G., Arkiv för Kemi 4, nr 12 (1951). — 2. Veselý, V., Štursa, F., Olejníček, H. and Rein, E., Collect. Trav. chim. Tchécoslovaquie I, 493 (1929). Chem. Zentr. 1930 I, 2734. — 3. Herzenberg, J. and Ruhemann, S., Ber. 60, 889 (1927). — 4. Coulson, E. A., J. Soc. Chem. Ind. 62, 177 (1943). — 5. Coggeshall, N. D. and Glessner Jr., A. S., Anal. Chem. 21, 550 (1949). — 6. Alder, K. and Stein, G., Angew. Chem. 50, 510 (1937). — 7. Morton, A. R. and Earlam, T. W., J. Chem. Soc. 1941, 159. — 8. Mulliken, S. P., Wakeman, R. L. and Gerry, H. T., J. Am. Chem. Soc. 57, 1605 (1935). — 9. Fieser, L. F., J. Am. Chem. Soc. 70, 3165 (1948). — 10. Arbuzov, B. A. and Spekterman, S. M., Trans. Kirov. Inst. Chem. Tech. Kazan 8, 21 (1940). Chem. Zentr. 1942 I, 482.

Tryckt den 28 mars 1952

Uppsala 1952. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB



Zur Kenntnis der Ascorbinsäure und Dehydro-Ascorbinsäure

Von HANS VON EULER und HANS HASSELQUIST

Mit 2 Figuren im Text

Während in der aromatischen und der heterocyklischen Reihe zahlreiche und zwar auch physiologisch wichtige Reduktone bekannt sind (Adrenalin, Arterenol, Echinochrom, 3-Oxy-Kynurenin, Anthocyanidine; Dialursäure), kennt man in der aliphatischen Reihe bisher nur *einen* Stoff, der, abgesehen vom Triose-Redukton, eine Sonderstellung unter den Reduktonen einnimmt: die Ascorbinsäure.

Obwohl die Ascorbinsäure seit ihrer Entdeckung und Identifizierung mit Vitamin C durch SZENT-GYÖRGY Gegenstand vieler Studien gewesen ist (KARRER, MICHEEL u. KRAFT, REICHSTEIN, HAWORTH, HIRST, ZILVA) harren auf diesem Gebiet noch mehrere physiologisch und chemisch nicht unwichtige Probleme ihrer Lösung, teils bezgl. der Oxydationsprodukte der Ascorbinsäure, teils bezgl. der Stereochemie ihrer Endiol-Gruppe; der für Ascorbinsäure und für Triose-Redukton gleichzeitig geführte Nachweis der Endiol-Gruppe¹ liegt der gegenwärtig angenommenen Konstitutionsformel der Ascorbinsäure zugrunde.

Die Endiol-Gruppe, welche der Ascorbinsäure die Dissociationskonstante einer mittelstarken Säure verleiht, nimmt 1 Na auf und vermittelt also die Bildung eines gut krystallisierenden Mono-Na-Salzes der Ascorbinsäure.² Die zweite Dissociationskonstante der Ascorbinsäure ist offenbar so klein, dass das Dinatriumsalz in wässriger Lösung zum grossen Teil hydrolysiert ist.

Ascorbinsäure verbindet sich, wie L. v. VARGHA³ feststellte, mit 1 Mol Aceton; die Aceton-Ascorbinsäure zeichnet sich durch sehr gute Krystallisationsfähigkeit aus; Schmp 220–222°. Sie lässt sich in alkoholischer Lösung mit Natronlauge scharf titrieren; durch Wasser wird diese Aceton-Verbindung leicht wieder gespalten.

Bei der Einwirkung von Diazomethan auf Ascorbinsäure werden, wie KARRER u. MITARB. sowie MICHEEL u. KRAFT übereinstimmend fanden, 2 Methylgruppen aufgenommen, von denen die eine durch Alkali verseifbar ist. Zunächst entsteht 3-Methyl-Ascorbinsäure; Schmp. 121°, Drehung $\alpha_D = +29^\circ$, Absorption 245 m μ .

Bei weiterer Einwirkung: 2,3-Dimethyl-Ascorbinsäure, Schmp. 63° (MICHEEL u. KRAFT⁴), $\alpha_D = +32^\circ$, Absorptionsband bei 235 m μ .

Ferner stellten HAWORTH u. MITARB.⁵ dar: 2,3,5-Trimethyl-Ascorbinsäure und 2,3,5,6-Tetramethyl-Ascorbinsäure.

KARRER hat auch Aceton-Ascorbinsäure mit Diazomethan methyliert.

¹ EULER u. MARTIUS, Sv. Kem. Tidskr. 45, 73, März 1933. — Lieb. Ann. 505, 73; 1933.

² P. KARRER, H. SALOMON, R. MORF u. K. SCHOPP, Biochem. Zs. 258, 4; 1933.

³ L. v. VARGHA, Nature, 130, 847, 1932. — 131, 363; 1933.

⁴ F. MICHEEL u. K. KRAFT, Z. physiol. Chem. 215; 215; 1933. — 222, 235; 1933.

⁵ N. W. HAWORTH u. Mitarb. Soc. (London) 1934, 1556. — 1937, 829.

Das 2 Methylgruppen enthaltende Produkt krystallisiert in blendend weissen Nadeln vom Schmp. 101° (MICHEEL u. KRAFT).

Über die Veresterung mit organischen Säuren, wie sie an Trioseredukten systematisch untersucht wurde, ist bei der Ascorbinsäure nur wenig bekannt.

Andere Derivate der Ascorbinsäure wurden erhalten mit: Triphenylchlormethan (V. VARGHA); Phenylisocyanat (HASSELQUIST)¹, 4 Mol Phenylisocyanat auf 1 Mol Ascorbinsäure.

Oxydation der Ascorbinsäure

Man weiss, dass die leicht eintretende Oxydation der Ascorbinsäure reversibel verläuft, ferner ist bekannt, dass bei derselben der Laktonring weitgehend erhalten bleibt. Erst bei stärkerer Oxydation treten grössere Veränderungen im Ascorbinsäuremolekül auf. Über die Bedingungen der Lakton-Ring-Öffnung der Ascorbinsäure liegen bis jetzt erst wenig Angaben vor. Man weiss, dass der einfachste Vertreter der Ascorbinsäuregruppe, die Oxytetronsäure von MICHEEL, KRAFT und JUNG², sehr stabil ist. Wir sahen uns also veranlasst, zunächst die Stabilität des Laktonringes der Ascorbinsäure zu untersuchen, also zu prüfen, unter welchen Bedingungen derselbe geöffnet, und dadurch die Endiolgruppe freigelegt wird.

Einfluss der Erhitzung 0,2%iger Ascorbinsäure-Lös. 1 Std. auf 100°

Lösung neutralisiert auf pH 7,3; 2 ccm titriert mit Tillmans Reagenz (I. LOEPER)

In 1 n. NaOH erhitzt, Min.	0	10	30	60
Verbraucht TR-Lös.	4,0	4,7	4,3	4,3

Beim Erwärmen der Ascorbinsäure in *alkalischer* Lösung (N₂-Atm.) erfolgt offenbar eine Aufspaltung des γ -Laktonringes unter Bildung des Alkalisalzes der entsprechenden Hexuronsäure. Bei weiterer Alkali-Einwirkung muss dann die Spaltung an der Doppelbindung eintreten.

Oxydation der Ascorbinsäure in saurer Lösung zu DHA

In 0,1 n. HCl erhitzt unter Luftdurchleiten, Min.	0	15	30	45
Verbraucht TR-Lös.	3,95	3,40	2,75	2,25

Eine *Spaltung des Laktonringes* der Ascorbinsäure scheint auch in stark saurer Lösung bei 100° nicht einzutreten. 300 mg Ascorbinsäure, in der Wärme in 3 ml konc. HCl gelöst, wurden auf dem siedenden Wasserbad bis zum vollständigen Verschwinden der HCl eingedunstet. Die Ascorbinsäure wurde dann unverändert in krystallinischer Form zurückerhalten.

Reaktionen mit Jod

Wie SZENT-GYÖRGYI sowie KARRER u. MITARB. (l. c.) angeben, verbraucht Ascorbinsäure in saurer Lösung 2 Atome Jod. Dieses Ergebnis können wir durchaus bestätigen; wie sich zeigt, geht dabei Ascorbinsäure (I) in Dehydro-Ascorbinsäure (DHA) (II) über. Die Reaktion verläuft also ganz analog mit der von MICHEEL u. JUNG³ an Oxytetransäure festgestellten Oxydation zum Lakton der α , β -Diketobuttersäure.⁴

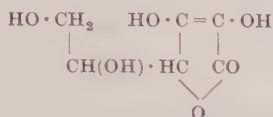
¹ Monographie, S. 20.

² F. MICHEEL u. Mitarb., Zs. physiol. Chem. 218, 280; 1933. — Chem. Ber. 66, 1291; 1933. — 67, 1660; 1934.

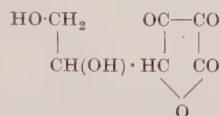
³ F. MICHEEL u. JUNG, Chem. Ber. 67, 1660; 1934.

⁴ Siehe auch ARNDT, LOEWE u. AYÇA, Chem. Ber. 84, 333; 1951.

In *alkalischer* Lösung werden nach KARRER u. MITARB. (l. c.) bei Überschuss von Jodlösung und dem anderthalbfachen der berechneten Menge NaOH in 15 Minuten 4 Atome Jod auf 1 Mol. Ascorbinsäure verbraucht.



(I) Ascorbinsäure



(II) Dehydro-Ascorbinsäure

Nach eigenen Versuchen können wir das Ergebnis KARRERS bestätigen. Es beruht auf dem Verbrauch von 2 Atomen Jod durch die primär entstehende Dehydro-Ascorbinsäure.

Reaktionen mit FeCl_3 , TiCl_3 ; Metall-Komplex-Bildung

Mit *Ferrisalzen* in neutraler wässriger oder alkoholischer Lösung gibt *Ascorbinsäure* keine wahrnehmbare Farbenreaktion, nach ARNDT¹, weil die zum Verschwinden der primär auftretenden Farbe führende Redox-Reaktion zu schnell verläuft.

In wässriger Lösung mit wenig NH_3 versetzt, gibt *Ascorbinsäure* schwach braune Färbung. *Dehydro-Ascorbinsäure* liefert schwache Eigenfärbung mit NH_3 , auch ohne Fe-Zusatz. *Dehydro-Ascorbinsäure* (II) gibt, mit FeCl_3 versetzt, keine Farbenreaktion, auch nicht nach 2-tägigem Stehen bei 20°.

Mit *Titanchlorid* treten in Methanol-Lösung folgende Farbenreaktionen auf (vgl. FR. WEYGAND u. E. CSENDES, Chem. Ber. 85 (1952)):

DHA gibt in Methanol mit TiCl_3 dunkelbraune Färbung und nach einiger Zeit braunrote Fällung.

DHA gibt in Methanol-Pyridin mit TiCl_3 braunrote Färbung und nach einiger Zeit orangerote Fällung.

Eigenschaften und Reaktionen der Dehydro-Ascorbinsäure

Dehydro-Ascorbinsäure entsteht bekanntlich leicht durch Oxydation von Ascorbinsäure, z. B. durch Jod (in Analogie mit der Bildung des Triketons aus Reduktinsäure² oder in alkalischer Lösung durch gasförmigen Sauerstoff (in Gegenwart von Cu-Spuren³) oder durch Oxydationsmittel, wozu sich nach unseren Erfahrungen (wie bei Dioxytetron⁴) Chinon am besten eignet.

Andererseits bilden die Reduktone Ascorbinsäure und Triose-Redukton wirk-same Redox-Katalysator-Systeme gegenüber Tyrosin⁵, Adrenalin und Arterenol, welch letztere ihrerseits die Entfärbung von Methylenblau im Thunbergrohr beschleunigen.

Wir haben die Dehydro-Ascorbinsäure (II) als farbloses Öl isoliert und gereinigt.

¹ Siehe hierzu die neue Untersuchung von F. ARNDT, L. LOEWE und E. AYÇA, Chem. Ber. 84, 333; 1951. — Ferner EISTERT, Arkiv f. Kemi, 2, No 6, 131; 1949.

² T. REICHSTEIN u. R. OPENAUER, Helv. Chim. Acta 16, 988; 1933.

³ EULER, K. MYRBÄCK u. H. LARSSON, Zs. physiol. Chem. 217, 1; 1933.

⁴ H. OHLE, Chem. Ber. 67, 555; 1934.

⁵ H. A. PAINTER u. S. S. ZILVA, Biochem. J. 46, 542; 1950.

In 1%iger wässriger Lösung reagiert DHA sauer; $\text{pH} = 3.83$ (zum Vergleich sei angegeben, dass eine 1%ige Lösung von Ascorbinsäure $\text{pH} 2.99$ zeigt). Daraus ergibt sich die Größenordnung der Dissoziationskonstanten $K = 10^{-5}$.

Die Oxydation der Ascorbinsäure zu Dehydro-Ascorbinsäure ist bekanntlich reversibel; durch H_2S , SnCl_2 , Sulfhydroverbindungen wird Ascorbinsäure leicht zurückgebildet, was für die quantitative Bestimmung der Ascorbinsäure wichtig ist. Vgl. PENNEY u. ZILVA, *Biochem. J.* 37. — ROE et al., *J. Biol. Chem.* 174.

Durch Einwirkung von Alkali wird der Laktonring aufgesprengt, und zwar leichter als derjenige der Ascorbinsäure. Es entsteht, wie die alkalimetrische Titration zeigt, die entsprechende Diketosäure.

DHA + Überschuss von 0,1 n NaOH, der sofort zurücktitriert wurde, ergab einen Verbrauch von rund 1 Mol NaOH.

DHA + Überschuss von 0,1 n NaOH, 60 Minuten auf sied. Wasserbad in N_2 -Atm. und dann folgende Rücktitrierung ergab einen Verbrauch von 2 Mol NaOH.

Oxydation der Dehydro-Ascorbinsäure

Der schon früher von uns beobachtete Verbrauch von *mehr* als 1 Mol TR per Mol Ascorbinsäure in alkalischer Lösung muss auf einer Reaktion durch die zunächst gebildete Dehydro-Ascorbinsäure beruhen. Diese bis jetzt nicht bekannte Oxydation der Dehydro-Ascorbinsäure wurde nun an der isolierten Dehydro-Ascorbinsäure untersucht.

5,8 mg reine Dehydro-Ascorbinsäure wurden in 10 ml Wasser gelöst; nach Einleiten von N_2 in das Reaktionsgefäss wurden 10 ml einer 0,1 n Natronlauge zugesetzt, worauf die Mischung mit TR-Lösung bei 40° titriert wurde. Dabei wurden 6,05 ml der 0,0112 n. TR-Lösung verbraucht, was 1,02 Mol Endiol (in alkalischer Lösung) entspricht.

Es bestätigt sich also, dass der Verbrauch von 2 Mol TR auf 1 Mol Ascorbinsäure auf der weiteren Oxydation der Dehydro-Ascorbinsäure beruht.

Es tritt dabei ev. Öffnung des Laktonringes vor Spaltung des Moleküls ein.

Derivate der Dehydro-Ascorbinsäure

Durch ihre 3 Carbonyl-Gruppen kann DHA Ausgangsmaterial für eine grosse Anzahl von Verbindungen mit Aminen, Hydrazinen, Semicarbazid, Phenylharnstoff u. s. w. werden. Inwieweit durch den Laktonring Hinderungen eintreten müssen erst präparative Versuche ergeben. Die durch Kombination von DHA mit Phenylendiamin dargestellten Derivate werden in einer bald folgenden Mitteilung von H. HASSELQUIST beschrieben und besprochen werden.

Zur Stereoisomerie der Ascorbinsäure

Die biologisch aktive Form der Ascorbinsäure, das Vitamin C, gehörte der L-Reihe der Kohlehydrate an², wie aus ihrer Beziehung zur L-Sorbose hervorgeht. Auch die D-Ascorbinsäure (D-Xylo-Ascorbinsäure ist hergestellt (REICHSTEIN u. Mitarb. — HAWORTH, HIRST, F. SMITH, STACEY).³

¹ Siehe auch KARRER u. Mitarb. 1. c. S. 7.

² Vgl. T. REICHSTEIN u. V. DEMOLE, E. BARREL-Festschr. Basel 1936. S. 107.

³ Siehe F. SMITH, Adv. in Carbohydrate Chem. 2, 79; 1946.

Über die räumliche Lage der freien, verätherten oder veresterten Endiol-Hydrolyse ist noch nichts bekannt.

Die cis-trans-Isomerie der Endiol-Gruppe, die am Triose-Redukton eingehend studiert wird¹, kann bei der Ascorbinsäure erst auftreten, wenn der Laktoring gesprengt ist. Dieser Umstand hat uns Anlass zur Untersuchung der Laktonring-Sprengung gegeben.

Injektion von Dehydro-Ascorbinsäure in Ratten

Die verschiedenen Effekte der mit DHA im Gleichgewicht stehenden Ascorbinsäure sind kürzlich von uns besprochen worden.²

Eine besondere Wirkung der DHA wurde 1950 von J. W. PATTERSON beschrieben: Sofort nach intravenöser Injektion von 10–50 mg DHA in etwa 100 g schwere Ratten tritt eine charakteristische Hyperaktivität ein, die nach etwa 2 Minuten zu einem Kollaps führt, von dem sich die Tiere bald wieder erholen. Nach der Erholung ertragen die Ratten weitere und nun erheblich grössere DHA-Dosen, aber auch die hervorgerufene Hyperaktivität ist geringer als nach der ersten Dose.

Physiologisch besonders bemerkenswert ist die Beobachtung PATTERSONS, dass DHA, das strukturell eine gewisse Ähnlichkeit mit Alloxan besitzt, ebenfalls imstande ist, Hyperglycaemie hervorzurufen. Mit Alloxan soll DHA synergistisch wirken. Auch Ascorbinsäure selbst soll nach PATTERSON einen ähnlichen Effekt zeigen wie DHA³, aber in wesentlich geringerem Grad. Die diabetogene Wirkung der DHA wird ihrer Fähigkeit zugeschrieben, Glutathion zu binden.

Wir haben die Versuche von PATTERSON in etwas abgeänderter Weise wiederholt, indem wir Ratten des im Vitamin-Institut propagierten Stammes 30 mg DHA intramuskular injizierten. Eine Hyperaktivität konnten wir nach der Injektion nicht beobachten. Auf eine kurze Periode verstärkter Athem-Tätigkeit und leisen Zitterns folgte eine etwa 1 Stunde andauernde Depression, nach welcher das Tier sich wieder vollständig erholte. Vermutlich trat in unserem Versuch eine Reduktion zu Ascorbinsäure ein, bevor die Dehydro-Ascorbinsäure zur Wirkung kam.

In weiteren Versuchen am gleichen Ratten-Stamm wurden per Tier (mittleres Gewicht 250 g) 50 mg Dehydro-Ascorbinsäure *intravenös injiziert*, wobei ein grösserer anfänglicher Effekt erzielt wurde.

Papier-Chromatographie

Die Versuche wurden teils mit aufsteigender, teils mit abfliessender Lösung in früher beschriebenen Apparaten in N₂ durchgeführt. Lösung: Butanol 80 Tle, Essigs. 20 Tle, Wasser 20 Tle. Entwicklung des Chromatogramms mit 0,005 n. TR-Lös. (Dichlorphenol-Indophenol). Es wurde stets die mit Säure bzw. Alkali auf 100° erhitzte mit der nicht vorbehandelten Ascorbinsäure verglichen. Dabei kamen entweder die sauren bzw. alkalischen Ascorbinsäure-Lösungen zur chromatographischen Anwendung.

¹ EULER u. H. HASSELQUIST, Dieses Arkiv 3, No 44, 1951. — B. EISTERT u. H. HASSELQUIST, Dieses Arkiv, 4, No 12, 1952.

² EULER und H. HASSELQUIST, Zs. f. physiol. Chem. 288, 4; 1951.

³ J. W. PATTERSON, J. Biol. Chem. 183, 81; 1950. — PATTERSON hat seine DHA-Lösungen nicht aus isolierter DHA dargestellt, sondern die mit Chinon oxydierte Ascorbinsäure verwendet.

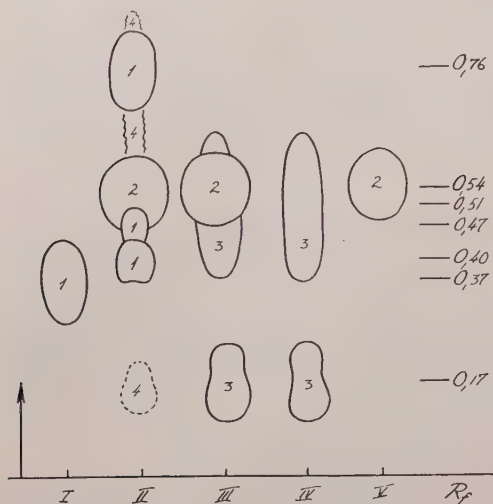


Fig. 1

- I. 60 mg As/ml Wasser
- II. 60 mg As/ml 1 n HCl, 60 Min. 100°
- III. 60 mg DHA/ml 1 n HCl
- IV. 60 mg DHA/ml Wasser
- V. 1 n HCl

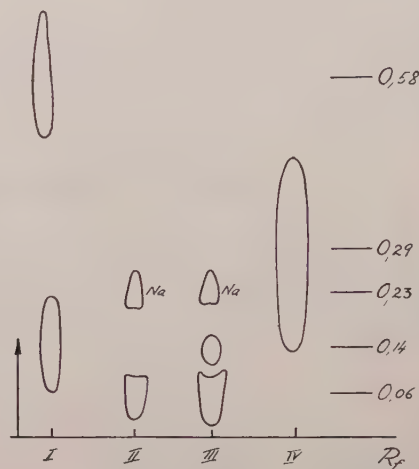


Fig. 2

- I. 50 mg DHA/ml Wasser
- II. 20 mg DHA/0,7 n NaOH, 30 Min. 100°
- III. 20 mg DHA wie II, nach 30 Min. neutral.
- IV. 10 mg As/ml Wasser

Chromatogramm der Ascorbinsäure und der Dehydro-Ascorbinsäure

Die Flecken treten in den Chromatogrammen in der durch die darin eingezeichneten Ziffern angegebenen Reihenfolge hervor.

- 1) Sofortige Entfärbung, auf rotem Grund
- 2) Nach 1 Min. auf rotem Grund
- 3) Nach Behandlung des Papiers mit NH_3 -Gas, sofort
- 4) Nach 10 Min. auf blauem Grund.

Ergebnis: Bei Behandlung mit HCl (II) erhält man aus DHA 3 Substanzen, die bezgl. Entfärbung von TR mit As gleichwertig sind (Endiole). Nur Spuren der ursprünglichen DHA findet man in II, Fig. 1. Vgl. auch III u. IV.

Stockholm, Universität, Vitamin-Institut und Inst. f. organ.-Chemische Forschung.

Tryckt den 5 april 1952

Uppsala 1952. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

The crystal structure of KSbF_4

By ANDERS BYSTRÖM, SIW BÄCKLUND and KARL-AXEL WILHELM

With 4 figures in the text

Three previous papers on the crystal chemistry of the complex antimony(III)-fluorides have been published in this Journal (1, 2, 3).

KSbF_4 was first prepared by FLÜCKIGER (3). He dissolved K_2CO_3 and Sb_2O_3 in the required proportions in dilute hydrofluoric acid and obtained crystals in the form of octahedra or needles. Both crystal types were analysed and their composition corresponded fairly well to the formula KSbF_4 . He showed further that the symmetry of the octahedra was orthorhombic.

In this investigation KSbF_4 was prepared by dissolving K_2CO_3 and Sb_2O_3 in the required proportions in a surplus of HF , evaporating to dryness, dissolving in H_2O and crystallizing at room temperature. The crystals formed thin plates, not in agreement with FLÜCKIGER's observations.

The following analytical data were obtained:

K: 16.4 %, Sb: 51.4 %, F: 32.0 %, compared with the values calculated for KSbF_4 :

K: 16.5 %, Sb: 51.4 %, F: 32.1 %.

As the habit of the crystals might indicate a layer-lattice, attempts were made to obtain the cleavage parallel to the plates. However, it appeared that this cleavage was difficult to obtain and the crystal only broke up into irregular fragments. Thus it seemed that the cohesion of the crystals perpendicular to the plates did not indicate a layer-lattice.

X-ray investigation of the crystals showed that the symmetry was orthorhombic with the following cell dimensions, determined from powder photographs (CrK , $\lambda_\alpha = 2.2909 \text{ \AA}$):

$$a = 16.30 \pm 0.02 \text{ \AA}, \quad b = 11.57 \pm 0.02 \text{ \AA}, \quad c = 4.546 \pm 0.01 \text{ \AA}$$

The a -axis was orientated perpendicular to the plates.

The density was determined to be 3.64 agreeing well with the calculated value of 3.67 assuming eight formula units in the cell.

It was deduced from Weissenberg photographs (Cu-K radiation) of the $h k 0$, $h k 1$, $h 0 l$, $h 1 l$, and $h 2 l$ reflexions, that the space group was $D_{2h}^{13} - P m m n$, assuming the structure to be centro-symmetric.

Only one arrangement of the metal atoms was found, which agreed with the observed intensities:

	x	y	z
4 Sb ₁ in 4(e) : $0 y_1 z_1$;		0.250 ± 0.003	-0.033 ± 0.004
4 Sb ₂ in 4(f) : $x_2 0 z_2$;	0.154 ± 0.001		0.433 ± 0.004
4 K ₁ in 4(c) : $\frac{1}{4} \frac{1}{4} 0$;			
4 K ₂ in 4(f) : $x_3 0 z_3$;	0.381 ± 0.006		-0.403 ± 0.015

The signs of the structure factors of the $h0l$ and $hk0$ reflexions were obtained with the above parameter values of the metal atoms from the trial and error calculations. Projections of the electron densities were calculated (see Fig. 1 and 2). The parameter values for the metal atoms from these projections agreed within the estimated errors with those from the trial and error process. A number of peaks were also obtained which might indicate the positions of the fluorine atoms.

If it is assumed that the distance F—F is ≥ 2.4 Å, then the following restrictions for the parameter values of the fluorine atoms in the general positions of the space group $D_{2h}^{13} - P m m n$ are valid (the symmetry elements are located as in the Intern. Tables (1937)):

$$0.07 \leq x \leq 0.43 \quad 0.1 \leq y \leq 0.4$$

Further, some forbidden areas for the fluorine atoms are found around the potassium atoms, because the distance K—F is probably ≥ 2.5 Å.

There were a number of discrepancies between observed F -values and those calculated with regard only to the metal atoms ($= F_{\text{Met.}}$ in the table), and it is to be expected that if the fluorine atom positions are found and the values of the structure factors of the fluorine atoms added to the calculated F -values, then most of these discrepancies will disappear.

As was discussed in a previous paper (3), the complex groups in the KSbF₄ compounds may be built up either of four-coordinated antimony atoms in mononuclear complexes of the formula SbF₄⁻ or of five-coordinated antimony atoms in polynuclear complexes. Different arrangement with four-coordinated Sb atoms were tried both with pyramidal SbF₄⁻ groups and with the fluorine atoms surrounding the Sb atoms in the corners of a tetrahedron (see (3)). However, in no case was an arrangement found that fulfilled the conditions obtained from the comparison of the observed F -values and the $F_{\text{Met.}}$ -values, nor did the positions of the fluorine atoms agree with those of the minor peaks in the electron density projections.

A close inspection of the observed F -values showed that the fluorine atoms must be placed so that $F_{\text{Fluor.}}(600)$ gets a large negative value ($F_{\text{Fluor.}}$ denotes the sum of the structure factors of the fluorine atoms). The electron density projections in (001) showed two maxima at $x = 1/12$, which might correspond to sixteen fluorine atoms in two general positions, and one at $x = \frac{1}{4}$ which might correspond to eight fluorine atoms in a general position (Fig. 1). The corresponding y -values give the reflexion 060, for which $F_{\text{Met.}}$ is equal to zero, a reasonable F -value (see the table below). Also in the Fourier projection (010) maxima corresponding to these x -parameters were found (Fig. 2) and with z -values, which gave reasonable Sb—F, K—F, and F—F distances. The eight remaining fluorine atoms must be placed in two four-fold positions for reasons of space, and the

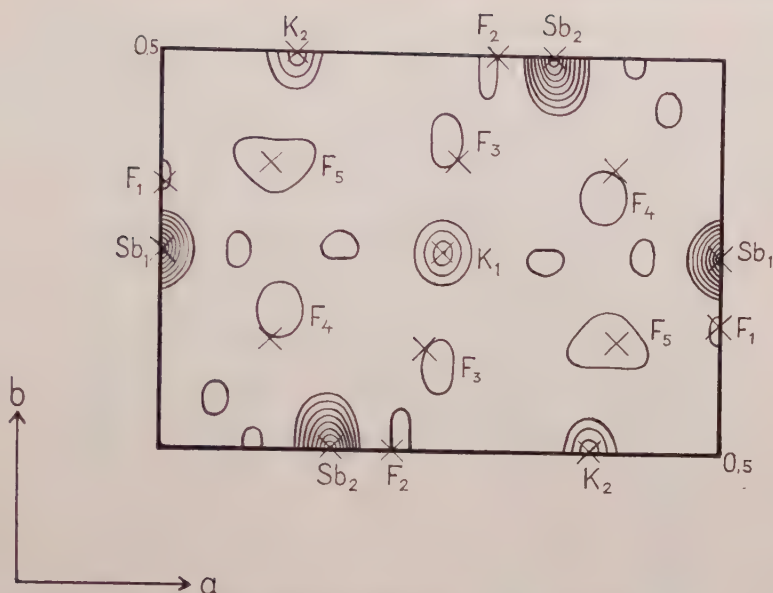


Fig. 1. KSbF_4 . Projection of the electron density on (001). The finally chosen parameter values are indicated with crosses.

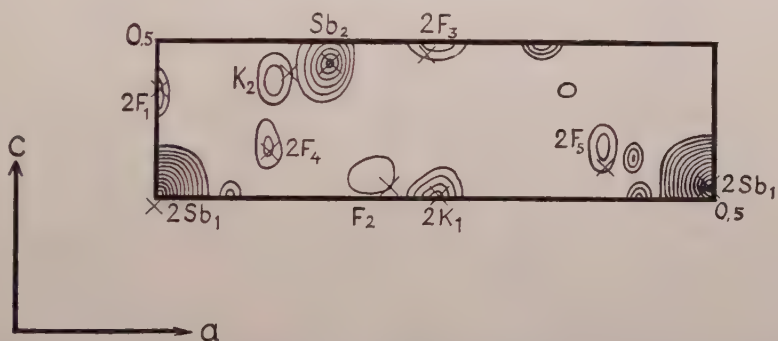


Fig. 2. KSbF_4 . Projection of the electron density on (010). The finally chosen parameter values are indicated with crosses.

following arrangement of the fluorine atoms also placed these atoms in positions corresponding to peaks in the two electron density projections:

	x	y	z
4 F_1 in 4(e) $0 y_4 z_4$		0.333 ± 0.015	0.347 ± 0.030
4 F_2 in 4(f) $x_5 0 z_5$	0.208 ± 0.015		0.042 »
8 F_3 in 8(g) $x_6 y_6 z_6$	0.236 »	0.125 »	0.500 »
8 F_4 in 8(g) $x_7 y_7 z_7$	0.097 »	0.139 »	0.139 »
8 F_5 in 8(g) $x_8 y_8 z_8$	0.097 »	0.361 »	-0.097 »

The final parameter values were chosen from trial and error calculations. The errors in the parameter values are also estimated from these calculations.

As will be seen from Fig. 1 and 2, there are a couple of extra maxima in both electron density projections of about the same height as those due to the fluorine atoms. These extra maxima are probably due partly to errors in the estimated F -values and partly to termination of series effects.

The magnitude of the influence of the fluorine atoms on the F -values in some favourable cases is demonstrated in the table below. As will be seen, the suggested parameter values are substantiated very strongly.

hkl	$ F_{\text{obs.}} $	$F_{\text{Met.}}$	$F_{\text{Fluor.}}$	$F_{\text{calc.}}$
6 0 0	150	246	-116	130
8 0 0	340	260	61	321
0 4 0	250	452	-180	272
0 6 0	60	0	88	88
0 8 0	310	332	88	420
1 3 0	90	56	30	86
3 3 0	110	-129	-2	-131
6 4 0	210	226	99	325
8 4 0	110	227	-57	170
5 7 0	80	52	18	70
7 7 0	70	94	-36	58
9 7 0	90	-121	18	-103
0 0 3	80	115	-45	70
1 0 3	-	22	2	24
2 0 3	110	82	18	100
5 0 3	60	-87	31	-56
6 0 3	80	27	72	99
7 0 3	60	48	1	49
0 1 1	120	39	53	92
0 1 2	-	-67	82	15
0 1 3	130	89	43	132
0 1 4	60	-89	8	-81
0 1 1	120	39	53	92
1 1 1	60	-60	16	-44
3 1 1	90	125	-2	123
4 1 1	40	-18	-46	-64

A further confirmation of the correctness of the suggested atomic arrangement was obtained from the $h2l$ reflexions. With the above y parameters of the fluorine atoms, the contribution of the fluorine atoms to the F -values of these reflexions is very small. Only for the four fluorine atoms in 4(*f*) may the structure factor be close to the maximal value. It is therefore to be expected that the values of $F_{\text{obs.}}$ and $F_{\text{Met.}}$ will agree more closely for these reflexions than for the $h0l$ and $h1l$ reflexions. This was found to be the case and, in fact, by the final determination of the z -parameters of the metal atoms the F -values of these reflexions were used.

The following interatomic distances are obtained:

$$\begin{array}{llll}
 \text{Sb}_1-\text{F}_1 = 1.98 \text{ \AA} & \text{Sb}_2-\text{F}_2 = 1.99 \text{ \AA} & \text{K}_1-4\text{F}_3 = 2.70 & \text{K}_2-4\text{F}_5 = 2.81 \\
 \text{Sb}_1-2\text{F}_5 = 2.06 \text{ \AA} & \text{Sb}_2-2\text{F}_3 = 1.99 \text{ \AA} & \text{K}_1-2\text{F}_4 = 2.87 & \text{K}_2-2\text{F}_3 = 2.80 \\
 \text{Sb}_1-2\text{F}_4 = 2.18 \text{ \AA} & \text{Sb}_2-2\text{F}_4 = 2.29 \text{ \AA} & \text{K}_1-2\text{F}_5 = 2.84 & \text{K}_2-2\text{F}_1 = 2.75 \\
 & & \text{K}_1-2\text{F}_2 = 2.98 & \text{K}_2-2\text{F}_2 = 3.45 \text{ and } 3.78 \text{ \AA}
 \end{array}$$

hedron with the bridge-forming fluorine atoms nearly on four of the six edges of the tetrahedron and the 12 remaining fluorine atoms in the corners of four triangles, each situated outside one of the four corners in the metal tetrahedron. In spite of the lack of fluorine atoms inside the Sb tetrahedron, there are probably no Sb-Sb bonds, because the Sb-Sb distances are 4.4 Å or bigger, thus considerably bigger than twice the metallic radius. The $\text{Sb}_4\text{F}_{16}^{4-}$ complexes are cemented together by the potassium atoms, these atoms being surrounded by 8-10 fluorine atoms at distances of 2.7-3.0 Å.

The mean distance Sb-F for the fluorine atoms linked only to one Sb atom is 2.01 Å, and the mean distance Sb-F in the Sb-F-Sb bridges is 2.24 Å. The difference between these distances is probably significant and due to the difference in bond numbers. As can be expected, the former distance is, within the limits of the errors, the same as the mean distance Sb-F for the five bonds in K_2SbF_5 , which is 2.03 ± 0.1 Å (3).

The arrangement of the fluorine atoms in CsSb_2F_7 and $\text{KSb}_4\text{F}_{13}$

The close relation between the configurations of fluorine atoms around the antimony atoms in K_2SbF_5 and KSbF_4 indicates that this arrangement, with five bonds directed towards five of the six corners of an octahedron, represents a distribution of bonds of high stability for the antimony atoms. The fact that a tetranuclear complex of the formula $\text{Sb}_4\text{F}_{16}^{4-}$ is formed in KSbF_4 in preference to mononuclear SbF_4^- groups with four bonds might well indicate that a coordination number of four is not to be expected for the tervalent Sb atoms at least in the complex fluorides. Indeed, the previously suggested binuclear complex Sb_2F_7^- in CsSb_2F_7 (2) with four Sb-F bonds seems now rather unlikely when the arrangement of bonds in K_2SbF_5 and KSbF_4 is known. However, before the structure of K_2SbF_5 had been solved, we thought a coordination number of five to be rather unlikely, as it very seldom occurs in oxides or fluorides. Because of the fact that the relative influence of the fluorine atoms on the structure amplitude is less in CsSb_2F_7 than in K_2SbF_5 and KSbF_4 , it was also more difficult to decide between the different arrangements of the fluorine atoms in CsSb_2F_7 , which were possible from space reasons. In connection with an attempt to solve the crystal structure of KSb_2F_7 (unit cell, see (3)), a re-investigation of the fluorine arrangement in CsSb_2F_7 will be made.

The suggested fluorine positions in SbF_3 (5) and $\text{KSb}_4\text{F}_{13}$ (1) imply the existence of SbF_3 molecules in these structures (see also discussion in (2)), with three strong bonds for the antimony atoms. The coordination number of three has been found for the bivalent Sb atoms in some antimonites (6) which are isomorphous with Pb_3O_4 and Pb_2SnO_4 ((7) and (8)) and also in the two modifications of Sb_2O_3 ((9) and (10)). It is therefore not improbable that the same coordination number for the antimony atoms is found also in SbF_3 and $\text{KSb}_4\text{F}_{13}$. However, if the further investigations of the crystal chemistry of the complex antimony (III) fluorides show that five-coordinate Sb atoms is a general feature in the structure of compounds of the formula types R_2SbF_5 , RSbF_4 , and RSb_2F_7 , then it is certainly necessary to re-investigate the suggested arrangements of the fluorine atoms in the compounds $\text{KSb}_4\text{F}_{13}$ and SbF_3 .

Table 1

Comparison between observed and calculated F values. Cu- K radiation. A question-mark after the value of $F_{\text{obs.}}$ indicates, that the reflexion is barely visible, and that the value of $F_{\text{obs.}}$ is very uncertain.

hkl	$ F_{\text{obs.}} $	$F_{\text{calc.}}$	hkl	$ F_{\text{obs.}} $	$F_{\text{calc.}}$
200	30	45	840	110	170
400	70	59	1040	—	—54
600	150	130	1240	170	125
800	340	321	1440	200	164
1000	70	32	1640	90	83
1200	330	243	1840	130	98
1400	170	100	150	70	42
1600	70	25	350	170	—134
1800	200	112	550	—	27
2000	230	193	750	60	82
020	—	7	950	90	—143
040	250	272	1150	—	—19
060	60	88	1350	140	114
080	310	420	1550	—	—28
0100	—	—36	1750	120	—65
0120	150	242	260	140	—132
0140	—	43	460	290	—332
110	—?	57	660	—	6
310	150	—198	860	80	—100
510	100	103	1060	90	—126
710	100	55	1260	100	—96
910	170	—122	1460	—	—35
1110	100	—63	1660	230	—213
1310	220	159	1860	—	—26
1510	90	—65	170	—	48
1710	140	—104	370	130	—132
1910	120	79	570	80	70
220	120	—242	770	70	58
420	180	—405	970	90	—103
620	—	25	1170	—	—50
820	140	—158	1370	140	140
1020	240	—202	1570	70?	—59
1220	180	—149	1770	100	—100
1420	70	—23	280	—	8
1620	290	—216	480	—	26
1820	70	—43	680	100	112
2020	80	—69	880	140	208
130	90	86	1080	—	8
330	110	—131	1280	190	181
530	100	100	1480	130	86
730	90	125	1680	60?	23
930	130	—125	190	—	63
1130	—	1	390	100	—93
1330	230	132	590	70	79
1530	—	—17	790	70	70
1730	150	—119	990	70	—76
1930	110	123	1190	—	—27
240	60	36	1390	170	147
440	60	65	1590	60?	—40
640	210	325			

$h\ k\ l$	$ F_{\text{obs.}} $	$F_{\text{calc.}}$	$h\ k\ l$	$ F_{\text{obs.}} $	$F_{\text{calc.}}$
2 1 0 0	100	-164	8 0 2	110	195
4 1 0 0	160	-222	9 0 2	—	-20
6 1 0 0	—	43	10 0 2	—	-6
8 1 0 0	80?	-114	11 0 2	70	-22
10 1 0 0	120	-191	12 0 2	200	170
12 1 0 0	80	-125	13 0 2	170	-112
14 1 0 0	—	-7	14 0 2	140	92
1 1 1 0	—	31	15 0 2	—	-55
3 1 1 0	90	-93	16 0 2	130	55
5 1 1 0	—	23	17 0 2	—	-29
7 1 1 0	—	66	18 0 2	110	74
9 1 1 0	80	-111	19 0 2	130	-99
11 1 1 0	—	-17	0 0 3	80	70
13 1 1 0	100	98	1 0 3	—	24
2 1 2 0	—	52	2 0 3	110	100
4 1 2 0	—	39	3 0 3	210	-215
6 1 2 0	130	206	4 0 3	130	178
8 1 2 0	100	149	5 0 3	60	-56
10 1 2 0	—	-4	6 0 3	80	99
12 1 2 0	80	133	7 0 3	50	49
1 1 3 0	—	30	8 0 3	90	-114
3 1 3 0	—	-85	9 0 3	90	-118
5 1 3 0	—	34	10 0 3	60	99
7 1 3 0	—	55	11 0 3	90	-117
9 1 3 0	80	-101	12 0 3	90	66
2 1 4 0	60	36	13 0 3	—	11
4 1 4 0	140	-239	14 0 3	90	74
0 0 1	40?	68	15 0 3	120	-69
1 0 1	70	69	16 0 3	160	161
2 0 1	150	220	17 0 3	100	-92
3 0 1	110	-110	0 0 4	—	46
4 0 1	220	263	1 0 4	140	-173
5 0 1	40	-30	2 0 4	—	-16
6 0 1	30?	-51	3 0 4	—	46
7 0 1	70	50	4 0 4	110	192
8 0 1	120	94	5 0 4	—	-50
9 0 1	—	-30	6 0 4	—	41
10 0 1	280	272	7 0 4	110	-173
11 0 1	—	-33	8 0 4	50?	77
12 0 1	130	90	9 0 4	—	-38
13 0 1	—	16	10 0 4	—	-16
14 0 1	70	20	11 0 4	—	-48
15 0 1	60	-27	12 0 4	100	105
16 0 1	210	160	13 0 4	140	-140
17 0 1	60	-30	14 0 4	—	56
18 0 1	60	39	0 0 5	70	109
19 0 1	40?	24	1 0 5	—	-52
20 0 1	50	86	2 0 5	—	13
0 0 2	280	388	3 0 5	90	-190
1 0 2	200	-165	4 0 5	—	14
2 0 2	40?	-14	5 0 5	40?	-59
3 0 2	30?	59	6 0 5	—	96
4 0 2	120	128	7 0 5	—	-19
5 0 2	40?	-49	8 0 5	30?	86
6 0 2	100	120	9 0 5	80	-155
7 0 2	100	-190	10 0 5	—	-26

Some preliminary data for NaSbF_4

The monoclinic unit cell of NaSbF_4 has the dimensions:

$$a = 8.1 \text{ \AA} \quad b = 5.5 \text{ \AA} \quad c = 8.5 \text{ \AA} \quad \beta = 96^\circ.$$

The extinctions indicate that the space-group is $C_{2h}^5 P 2_1/c$, $C_{2h}^2 - P 2_1/m$ or $C_2^2 - P 2_1$. Trial and error calculations show that a good agreement is obtained between observed and calculated intensities with the antimony atoms in the position 4(e) of the space group C_{2h}^5 and with the parameters: $2\pi x_1 = 119^\circ$, $2\pi y_1 = 103^\circ$, $2\pi z_1 = 50.5^\circ$.

This investigation has been financially supported by the Swedish Natural Science Research Council. One of the authors (A.B.) is indebted to the Foundation Lars Hiertas Minne for a grant.

SUMMARY

The crystal structure of KSbF_4 has been determined. The orthorhombic unit cell has the dimensions:

$$a = 16.30 \pm 0.02 \text{ \AA} \quad b = 11.57 \pm 0.02 \text{ \AA} \quad c = 4.546 \pm 0.01 \text{ \AA}$$

The atoms are placed in the following positions:

$D_{2h}^{13} - P m m n.$	x	y	z
4 Sb_1 in 4(e): $0 y_1 z_1$		0.250	-0.033
4 Sb_2 in 4(f): $x_2 0 z_2$	0.154		0.433
4 K_1 in 4(c): $\frac{1}{4} \frac{1}{4} 0$			
4 K_2 in 4(f): $x_3 0 z_3$	0.381		-0.403
4 F_1 in 4(e): $0 y_4 z_4$		0.333	0.347
4 F_2 in 4(f): $x_5 0 z_5$	0.208		0.042
8 F_3 in 8(g): $x_6 y_6 z_6$	0.236	0.125	0.500
8 F_3 in 8(g): $x_7 y_7 z_7$	0.097	0.139	0.139
8 F_5 in 8(g): $x_8 y_8 z_8$	0.097	0.361	-0.097

The antimony atoms each form five Sb-F bonds with Sb-F distances of 2.0-2.3 Å. Four antimony atoms are linked together to a tetranuclear complex of the formula $\text{Sb}_4\text{F}_{16}^{4-}$.

The unit cell, probable space group, and antimony atom positions in NaSbF_4 are given.

University of Stockholm

Institute of Inorganic and Physical Chemistry, October 1951.

REFERENCES: 1. Byström, A. and Wilhelmi, K.-A., Arkiv Kemi 3, 17, (1950). — 2. —, Ibid 3, 373 (1951). — 3. —, Ibid 3, 461 (1951). — 4. Flückiger, F. A., Pogg. Ann. 87, 245 (1852). — 5. Byström, A. and Westgren, A., Arkiv Kemi, Miner. B 17, No 2 (1943). — 6. Ståhl, S., Ibid B 17, No 5 (1943). — 7. Byström, A. and Westgren, A., Ibid B 16, No 14 (1943). — 8. Byström, A., Ibid A 25, No 13 (1947). — 9. Buerger, M. J. and Hendricks, S. B., Z. Krist. A 98, 1 (1937). — 10. Almin, K. E. and Westgren, A., Arkiv Kemi, Miner. B 15, No 22 (1942).

Tryckt den 5 april 1952

Uppsala 1952. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB



Studies in experimental rheumatism. II

Effects of desoxycorticosterone acetate (DCA) overdosage and of focal streptococcal infection on scorbutic guinea-pigs

B. Clinical results

By LEO HELLER and HANS VON EULER

1. General status

In experiment 1 (no streptococcal infection) all the test animals showed evidence of increasing sickness. The fur of the guinea-pigs proved to be the most sensitive indicator of illness. Starting on the 13th–14th day of the experiment, the fur of the animals began to lose its natural lustre, becoming increasingly dull and greasy and hairing more and more abundantly. Diffuse swellings of big parts of the body, most intensive in the hind extremities and pelvic regions, could be seen about the 16th day, increasing steadily in intensity. In its earlier stages oedema had some tendency to concentrate predominantly around the bigger joints, making sometimes the impression of true arthritic involvement (see below). The innate alertness and vivacity of the animals disappeared also gradually, being replaced by general prostration and relative immobility. Face-ache positions of the body, similar to those described as characteristic for scurvy in guinea-pigs (11), were also sometimes observed. There was a generalized hyperaesthesia, which manifested itself at palpation by shrieking and defense movements. The muscles showed an increased tonus and spasticity, rendering both active and passive movements rather difficult, and in some of the animals persistent quivering spasms in different muscle groups made their appearance about the 20th day. Small haemorrhages could be seen in the skin of the abdomen.

The terminal picture, immediately prior to sacrificing the animal for biochemical, serological and pathological studies, which presumably preceded a spontaneous lethal outcome for at most 1–2 days, was characterized by a high degree of apathy, dyspnea and in some cases an almost complete paralysis of big muscle groups.

The two animals, which were given abundantly orange juice in that preterminal stage of disease, showed a rapid and dramatic improvement following this simple measure — a proof that the syndrome as a whole was due to the joint influence of DCA and of scurvy. Diffuse swellings, muscle spasticity, quivering and dyspnea disappeared in a few days, and the animals regained their former alertness.

The two scorbutic controls (guinea-pigs IX and X) exhibited only very discrete signs of chronic scurvy, showing somehow dull and dirty fur about the 20th day

as well as a certain amount of muscle quivering and slight spasticity, which disappeared, however, after a few days.

One of those animals (No. X) showed a spontaneous superficial ulceration of the skin in the proximity of the left eye and nose, with no tendency for suppuration. The general condition of the scorbutic controls (IX a. X) was never definitely bad, in contrast to that of the test group, subjected to combined treatment. The non-scorbutic controls (VII a. VIII) remained in an excellent condition to the end of the experiment (Table 1).

2. Role of the streptococcal infection

Treatment with hemolytic streptococci (experiment 2 — Table 1) did not seem to modify the general trends of behaviour of the animals, as described for experiment 1. At the moment of the 1st establishment of the infectious focus, all the animals of the test-group (scurvy + DCA) — Nos. A₁ to A₅ — showed already stronger or weaker evidence of sickness, such as dull and dirty fur, hairing, oedemas, general prostration and muscle stiffness, especially in the hind legs. Streptococcal infection did not seem to aggravate the clinical status of the animals, with the possible exception of the guinea-pig A₅, dead of pneumonia on the 8th day after injection of bacteria. As no bacteriological examination of the lungs, which showed distinct pneumonic changes, could be performed, the question of identity of the micro-organism responsible for the lung lesions and probably for the death of the animal with that previously injected could not be resolved.

As a matter-of-fact, the symptoms of disease appeared in the testgroup of experiment 2 somehow later, and were distinctly less severe than in the comparable group of the 1st experiment, notwithstanding the still more limited vitamin C supply in the former. The animal A₃, which did not receive any bacteria, differed in no respect from the infected animals, except for the absence of local lesions on the sites of injection, to be described below. The sex difference between the animals of both experiments might here have played a role.

The non-scorbutic, DCA-treated controls of experiment 2 (B₁ and B₂) showed a considerably better condition than their scorbutic mates, though a slight amount of muscle spasticity, quivering and oedema could be observed on the 17th day of the experiment (12th of the DCA-treatment) with no tendency to aggravation on continued DCA administration. The clinical condition of those animals remained to the end impressively better than that of the test-group (animal B₁ died suddenly on the 34th day of the experiment during the subcutaneous injection of the hormone—probably by brain embolism).

The untreated control (B₄) remained perfectly alert and vigorous to the end of the experiment.

No symptoms of anaphylaxis were observed after the second injection of homologous bacteria, given in a considerably higher (5–20-fold) dose to both the test and the control animals (Table 1).

3. Body weight

The presence of oedema in the animals of both test groups, especially in those of the last experiment (see below), prohibits the use of body weight changes as a measure of the gravity of the status of the animals and an index of the degree of scurvy present (11). However, notwithstanding this serious impairment, tending

to counteract the slower increase or even loss in body substance due to disease, the differences in average body weight gains per day between the test and the control groups, as shown in Table 1, are quite impressive, though not strictly significant on statistical analysis ($0.05 < P < 0.1$).

4. Oedema

Oedema, in itself a symptom of mineralocorticoid overdosage (15), aggravated by administration of sodium chloride, was, however, much more intensively developed in the test-animals than in the non-scorbutic DCA-controls (B_1 , B_2). The dramatic improvement observed in the moribund animal IV a few hours after oral administration of 3 ml orange juice (corresponding to ca 2.5 mg of ascorbic acid) as well as a perhaps less dramatic but very impressive improvement, obtained by addition of orange juice to the diet of animal No. V, must be interpreted as depending on some existing interrelationship between both factors studied. The dramatic improvement of the general clinical status of the animals was followed by a rapid decrease of the intensity of oedema, suggesting an influence of the ascorbic acid supply upon the water-electrolyte metabolism as regulated by mineralocorticoids.

The oedemas were much more intensive in the test group of the 1st experiment than in that of the 2nd one, due to the replacement of the Na-ion by the K-ion in the drinking-water in the later stage of experiment 2 (see Table 1, footnote 2). In both experiments, however, they were much more intensive in the test- than in the control-animals. The oedemas concentrated regularly in the hind parts of the body and in the hind legs, having often a tendency to accumulate around the joints, which gave an impression of true arthritic joint swellings (4). No intraarticular ex- resp. transsudation could, however, be found at autopsy.

5. Joints

No articular changes could be found in any of the animals. The quantity of synovial fluid present in the big joints was not increased (see above), but there was a tendency of the oedemas and haemorrhages to concentrate around the joints, possibly on purely mechanical grounds. No redness, implicating the presence of an inflammatory process, could be observed in the test animals or in the DCA-controls, contrarily to the findings of Schaffenburg et al. (4).

6. Muscles

The histological findings in the skeletal and heart muscles will be reported later, together with the results of the pathological examination of the adrenals of the experimental animals. Only the macroscopically discernible changes will be described here.

The autopsy of the test animals of both experiments revealed striking changes in the gross macroscopical appearance of the skeletal muscles of the extremities and of the abdomen. These changes — probably of a degenerative nature — consisted in a striking fragility of the muscles, resulting in their rupture following a rather slight tearing. This change in muscle consistence was most distinct in the hind parts of the body and in the muscles of the thigh. The tonus of the muscles was at the

Group	Exper- iment No.	Ani- mal No.	Sex	Treatment:			Sacrificed after: (days)	General habitus
				Vit. C deficiency	DCA	Strep- tococ- cal in- fection		
I. Healthy controls	1	VII	♀	—	—	—	42	Healthy, alert, active
	1	VIII	♀	—	—	—	42	» » »
	2	B ₄	♂	—	—	twice	49	» » »
II. Scorbatic controls	1	IX	♀	+	—	—	41	Moderately active, rather well looking
	1	X	♀	+	—	—	38	Slightly apathic, but not definitely sick
III. DCA-controls	1	IV	♀	The 1st 16 days	+	—	40	On 16th day very sick, rapid improvement after vit. C
	1	V	♀	The last 16 days	+	—	40	»
	2	B ₁	♂	—	+	once	34 ¹	Slightly morose, but not definitely sick
	2	B ₂	♂	—	+	twice	47	Moderately active and alert, rather well looking
IV. Test group (combined scurvy-DCA treatment)	1	I	♀	+	+	—	22	Sick, cyanotic, goes slowly and with difficulty
	1	II	♀	+	+	—	35	Very sick, immobile, lying in the cage
	1	III	♀	+	+	—	34	Weak, goes with difficulty but not very ill
	1	VI	♀	+	+	—	30	Sick, dyspnoic (at autopsy hydrothorax), goes with difficulty
	2	A ₁	♂	+	+	twice	47	Very sick, can scarcely
	2	A ₂	♂	+	+	»	47	Moderately sick, dyspnoic
	2	A ₃	♂	+	+	—	48	Sick, goes very slowly
	2	A ₄	♂	+	+	twice	36	Moderately sick, dyspnoic (at autopsy pneumonia)
	2	A ₅	♂	+	+	once	26 ³	Very sick, dyspnoic (at autopsy pneumonia)

¹ Spontaneous, sudden death during DCA-injection (embolia cerebri?).² In the later period of expt. 2 the NaCl in drinking water was replaced by the same per-

the animals.

Fur	Palpable oedema (at death)	Stiffness of hind legs	Trembling twitches, etc.	Tenderness on palpation	Body weight (in grams)				Haemorrhages (visible)	Skin-ulcerations
					Initial	At death	Aver. gain per day	Group mean		
Shiny	Absent	Absent	—	—	256	446	+ 4.4		—	—
»	»	»	—	—	301	450	+ 3.55	+ 3.9	—	—
»	» ²	»	—	—	340	520	+ 3.7		—	—
Dull	»	»	Slight quivering	Slight	310	475	+ 4.0		—	—
»	»	»	»	»	285	390	+ 2.8	+ 3.4	—	+
Dull, loss of hair	Almost totally disappeared	Moderate	Trembling, which disappeared after vit. C	— (disappeared)	264	327	+ 1.5		—	1st +, later —
Dull, loosens hair	Almost disappeared	Moderate	»	— (disappeared)	275	414	+ 3.5	+ 2.5	—	1st +, later —
Dull, rather shiny	Slight	Moderate	Jerks and twitches	Slight	302	397	+ 2.8		—	—
Dull, shiny	Slight ²	Slight	Trembling, sporadic jerks	»	285	397	+ 2.3		—	—
Dull (oily) loosens hair	Strongly oedematous	Intensive	Jerks	Intensive	275	395	(+ 5.5)		+	+
»	Moderate	»	Twitches	»	283	376	(+ 2.7)		+	+
»	Strong	»	Jerks	Moderate	292	365	(+ 2.15)		+	±
»	Moderate	Moderate	—	»	284	425	(+ 4.7)		+	+
»	Slight ²	»	Trembling and twitches	Intensive	324	254	— 1.5	+ 1.6	+	+
»	Rather slight ²	Intensive	Sporadic twitches	Moderate	283	276	— 0.15		+	+
»	Moderate ²	»	—	»	274	298	+ 0.5		+	+
»	Slight (almost disappeared after elimination of NaCl in drinking water)	»	—	»	355	317	— 1.0		+	+
Dull, loosens hair	Slight	Slight	Trembling	Slight	361	270	— 3.5		—	—

centage (1 %) of KCl, which resulted in a rapid decrease of oedema in guinea-pigs A₁, A₂ and A₃. (Guinea-pigs B₄ and B₂ were never oedematous resp. strongly oedematous).

² Spontaneous death (pneumonia).

same time strongly increased, and their usual elasticity practically lost, which further increased their fragility. The degree of the water imbibition of the muscles corresponded approximately to the degree of oedema, palpable *in vivo*. The subcutaneous fatty tissue overlying the muscle groups was extremely atrophic and frail, the latter probably because of a degeneration of collagen fibers in the connective tissue. Diffuse haemorrhages were also present in great numbers.

All those changes in the muscles and in the subcutis were fully developed in the test animals only. Haemorrhages (Table 2) were much more numerous in the skin and muscles of the test animals than in those of the scorbutic controls (VII a, VIII). The non-scorbutic animals showed no presence of haemorrhages. The DCA-controls (B_1 and B_2 , or IV and V after administration of vitamin C) showed only a certain amount of muscle stiffness, but no distinct changes of their consistence at autopsy and no hemorrhages.

7. Abscesses

The injection of living hemolytic streptococci resulted as a rule in the formation of localized abscesses only and showed no tendency to generalized septical dissemination. In the control animals B_1 , B_2 and B_4 these abscesses were already either almost totally resorbed or well encapsulated, while in the test animals (A_1 , A_2 , A_4 and A_5) they were much bigger, showing the presence of necrotic masses surrounded by a relatively thin capsula. This difference was probably due, at least partially, to the decrease of the resistance to infections, following the vitamin C deficiency.

8. Incisor-root changes

The degree of scurvy, estimated using the modified tooth method of Höjer (12), was higher in the test animals than in the purely scorbutic controls. As will be seen from Table 2, a complete lack of protection (grade 0) against scurvy could be demonstrated in the former group, while the chronically scorbutic animals, receiving no DCA (IX, X), showed a weak but distinct protective effect, due to the low vitamin C doses, received by all animals of the scorbutic groups. This seems to indicate an aggravating effect of desoxycorticosterone acetate on scurvy, which found its clinical expression in the exaggeration of the haemorrhagic diathesis and the exacerbation of the general status as described above under 1.

9. Adrenal ascorbic acid levels

The vitamin C content of the adrenals was, as it could be expected, uniformly low in the adrenals of all animals, held on the scorbutogenic diet, supplemented by minimal amounts of ascorbic acid (test animals and scorbutic controls). The values obtained for the two scorbutic controls, which did not receive any DCA, lay within the range of those obtained for the test groups of both experiments. Thus the impressively aggravating effect of DCA on the clinical and pathological (tooth changes) symptoms of scurvy were not accompanied by a corresponding effect upon the adrenal ascorbic acid. It is, however, possible, that the effective tissue concentration of ascorbic acid, decisive for the clinical picture, was still lower in the test animals than in the pure scurvy group.

Table 2

Intensity of the scorbutic symptoms.

Experiment No.	Animal	Treatment:			Group	Histological changes in the teeth (Amount of protection, using the scale of Key and Elphick (12))	Haemorrhages		Adrenals:		
		Vit. C deficiency	DCA	Strep-tococcal infection			Superficial (visible in vivo)	Deep (at autopsy)	Weight of the organs (mg)	Ascorbic acid content g/mg wet weight	g/total adrenal
1	VII	-	-	-	I	4	-	-	198	0.398	78.9
1	VIII	-	-	-		4	-	-	197	0.760	150.0
2	B ₁	-	-	+		4	-	-	282	0.876	246.8
1	IX	+	-	-	II	1	-	slight, knee joints only	174	0.024	4.2
1	X	+	-	-		2	-	»	242	0.118	28.6
1	IV	The 1st 16 days	+	-	III	2	disappeared on addition of vit. C	-	224	0.307	68.7
1	V	»	+	-		3	»	-	148	0.215	31.9
2	B ₁	-	+	+		4	-	-	not determined		
2	B ₂	-	+	+		4	-	-	230	0.388	89.2
1	I	+	+	-	IV	not determined	+	numerous, diffuse, more intensive near the joints	not determined		
1	II	+	+	-		0	+	»	246	0.005	1.5
1	III	+	+	-		0	+	»	250	0.008	2.0
1	VI	+	+	-		0	+	»	172	0.012	2.1
2	A ₁	+	+	+		0	+	»	346	0.009	3.1
2	A ₂	+	+	+		0	+	»	271	0.052	14.1
2	A ₃	+	+	-		0	+	»	206	0.083	17.1
2	A ₄	+	+	+		0	+	»	236	0.025	5.9
2	A ₅	+	+	+		not determined	-	moderate, diffuse	not determined		

10. Differential sheep erythrocyte agglutination test

No significant differential agglutination titers against unsensitized and sensitized sheep red blood cells, as described for human patients with active rheumatoid arthritis (13; 14) were found using the sera of the experimental animals of all groups studied.

The above findings will be discussed in connection with the results of the histopathological examination of the muscle and adrenal tissues in a subsequent paper.

Stockholm University, Vitamin Institute.

REFERENCES: 1. **H. v. Euler** and **L. Heller**, Sv. Vet. Arkiv f. Kemi 3, Nr 13 (1951). — 2. **B. H. Waksman**, Medicine, 28, 143 (1949). — 3. **H. Selye**, **O. Sylvester**, **C. E. Hall** and **C. P. Leblond**, J. Am. Med. Ass. 124, 201 (1944). — 4. **C. Schaffenburg**, **G. M. C. Masson** and **A. C. Corcoran**, Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med. 74, 358 (1950). — 5. **J. F. Rinehart**, Ann. Int. Med. 9, 586 (1935); J. Lab. a. Clin. Med. 21, 597 (1936). — 6. **J. F. Rinehart**, Ann. Rheum. Dis. 3, 154 (1943); 5, 11 (1945). — 7. **G. Dalldorf**, J. Exp. Med. 53, 289 (1931). — 8. **I. A. B. Cathie**, J. Clin. Path. 2, 73 (1949). — 9. **P. Hedlund**, The Scand. J. of Clin. a. Lab. Invest., 1, 351 (1949). — 10. **Bessey** and **King**, J. Biol. Chem. 103, 687 (1933); **Bessey**, J. Ass. Offic. Agr. Chem. 27, 537 (1944). — 11. **K. H. Coward**, The Biol. Standardization of the Vitamins, London 1938 p. 87. — 12. **Key** and **Elphick**, Bioch. J. 25, 888 (1931) cited by (11). — 13. **H. M. Rose**, **Ch. Ragan**, **E. Pearce** and **M. Lipman**, Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med. 68, 1 (1948). — 14. **J. Ball**, The Lancet, 259, Nr. 6637, p. 520 (1950). — 15. **H. Selye**, Textbook of Endocrinology (Acta Endocrinologica, Montreal 1947).

Tryckt den 28 mars 1952

Uppsala 1952. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

Elution and displacement analysis procedures with special reference to chromatography on carbon

By L. HAGDAHL, R. J. P. WILLIAMS and A. TISELIUS

With 27 figures in the text

For some time now it has been customary to discuss chromatographic procedures under three headings, frontal analysis, displacement analysis and elution analysis. Frontal analysis differs from the other two in so far that separation of compounds is not attempted but only their identification and estimation (1). A modification of frontal analysis, termed carrier frontal analysis (2), can be used as a separation procedure but its use depends on the same principles as displacement analysis, and it will therefore be convenient to discuss it below under this heading.

While it has been recognised that many elution techniques involve displacement, in a modified form, no attempt has been made to bring the concepts together in a general treatment. It will be the purpose of this article to see if any such generalisation is possible. To this end much new data will be presented on the effect of one substance on the adsorption of another.

Elution analysis

Here the term "elution" will be used to describe the developing procedure for a chromatogram when the compound, A , under investigation can be readily adsorbed in the presence of the developing solution so that it travels more slowly than the developer front. Two cases of development in such a way can be considered separately

- (1) with a pure solvent, S_1 ,
- (2) with a solvent containing an additional developer, B , which may be adjusted in concentration.

The movement of the compound, A , will depend only upon the extent of its adsorption in the pure solvent in case (1) and it can be predicted from the adsorption isotherm obtained in the presence of this solvent (3). However, a change of solvent or the addition of a developer, B , to the solvent can change the movement of A in two distinct ways. Firstly the solubility of A may be changed, and secondly as the new solvent, S_2 , or the developer, B , may be adsorbed differently from S_1 , the adsorption of A will be modified. Both the change in the solubility and the change in the adsorption will be reflected in the change of the adsorption isotherm. Thus a study of adsorption isotherms of substances A in the presence of solvents, S , and developers, B , might be expected to yield valuable results.

Displacement analysis

The term, "displacement", will be employed here to describe the developing procedure for a chromatogram when the compound, *A*, under investigation, is so slightly adsorbed in the presence of the developer, *B*, in a solvent *S*, that it travels faster in *B* than does the zone of *B* itself, and therefore moves to form a zone in front of *B*.

In the early discussions of displacement it was pointed out by TISELIUS (4) that the step heights obtained in the displacement diagram (Fig. 1 b), were rigidly determined by the adsorption isotherms of *A* and *B* in the given solvent. This is shown again in Fig. 1 (a) and (b).

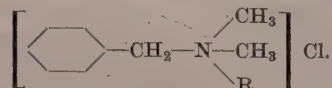
In Fig. 1 (a) any dotted line through the origin, e.g. *OX*, is the locus of points of constant $\frac{m}{c}$ values, that is, of constant rate of movement in a column. Now in the given case this line will cut any curved isotherm at a concentration which will travel at this constant rate, i.e. the concentrations $\bar{C}_A$ and $\bar{C}_B$ of *A* and *B* respectively, in fig. 1 (a).

If an experiment is considered in which a mixture of *A* and *B* is first applied to a column, with *B* at a concentration $\bar{C}_B$, and followed by a solution of *B*, concentration $\bar{C}_B$, then, in a purely descriptive way, if *A* is to be displaced by *B* it must move out in front of *B*. Thus any concentration of *A* in *B* must move faster than the *B* front. Again the *A* zone formed can not move in front of the *B* zone as an elution peak unless the speed line *OX* lies above the isotherm of *A* for all $\bar{C}_A$ values. In the latter case all concentrations of *A* move faster than $\bar{C}_B$ and an elution peak of *A* is obtained. It is clearly seen that the displacement of *A* by *B* is dependent in the first place on the concentration of *B* being chosen so that it travels faster than *A* would alone, in the absence of a displacer. In this case the zones travel as in Fig. 1 (b).

Many displacement experiments have been carried out in which diagrams of the same kind as Fig. 1 (b) have been obtained. An example is afforded by Fig. 2. which is a displacement of Tryptophan by Zephiran Chloride¹ in acid solution. As in many displacement experiments the yield of tryptophan from the column was high — 96% of the amount applied to the column. Although the displacement is remarkably good in this case many others have been obtained which are less satisfactory. In these cases the substance *A*, which should have been displaced, travelled partially behind the front of the displacer. The question arises as to whether it is possible to decide under what conditions *A* will travel so that it is completely displaced by *B*. This discussion can be approached with the aid of a second set of isotherms.

Fig. (3) shows the isotherms of *B*, the displacer, in a concentration of *A*, $\bar{C}_A$ (it being assumed that this isotherm is little changed from that in fig. 1 (a) as *B* is more strongly adsorbed than *A*), and of *A* in a concentration of *B*, $\bar{C}_B$, the depression of the *A* isotherm being dependent on the value of $\bar{C}_B$ chosen. The new speed line

¹ Zephiran Chloride is the trade name for the mixture of compounds of formula



where R is a mixture of alkyl radicals $\text{C}_8\text{H}_{17} \rightarrow \text{C}_{18}\text{H}_{37}$.

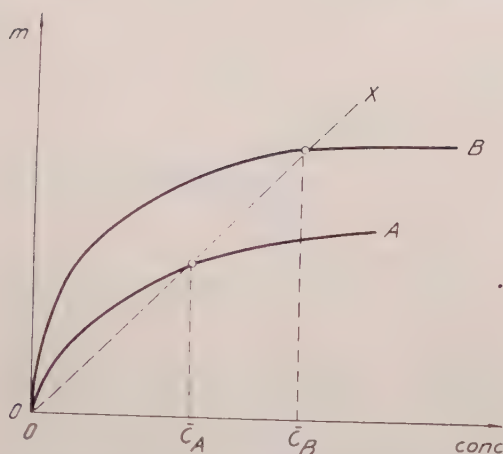


Fig. 1 a. Schematic representation of the isotherms of a displacer B and a substance A where m is the amount of material adsorbed.

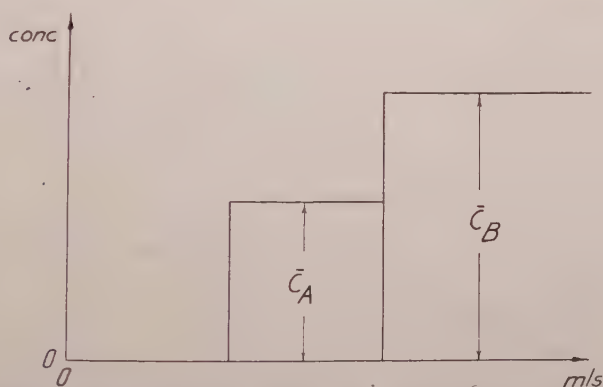


Fig. 1 b. The resulting displacement of A by B , the isotherms being those shown in fig. 1 a. The volume is expressed as mls. of the effluent.

OX' is drawn to cut the isotherm of B at $\bar{c}_B$ the same concentration as in fig. 1 (a). This line does not cut the isotherm of A at all which means that, in the case under consideration, all concentrations of A in $\bar{c}_B$ (in $\bar{c}_A$) in the column. Thus A will be completely displaced by B , and in such a case the substances A and B move as zones adjacent to one another and the conditions of adsorption revert to those given by the isotherms in fig. 1 (a). This means that the isotherms in the pure solvent will give the step-heights in a displacement diagram if 'ideal' displacement has occurred, the latter condition being controlled by the relative isotherms in fig. (3) — that is the isotherms of each substance in the presence of the other. It is now possible to define displacement in terms of fig. 3. An 'ideal' displacement will occur when the speed line OX' drawn for a given concentration, $\bar{c}_B$, of the displacer, does not cross the adsorption isotherm of A in $\bar{c}_B$. An 'ideal' displacer for a compound A will give 'ideal' displacement at any concentration of the displacer

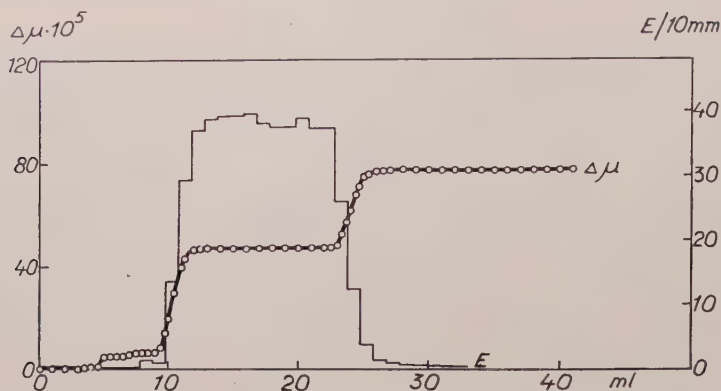


Fig. 2. An experimentally determined displacement of an ideal character. The experiment was followed in a comparative interferometer ($\Delta\mu$ is the observed refractive index differences) and E is the extinction ($\lambda = 270$) due to the displaced tryptophan (see text).

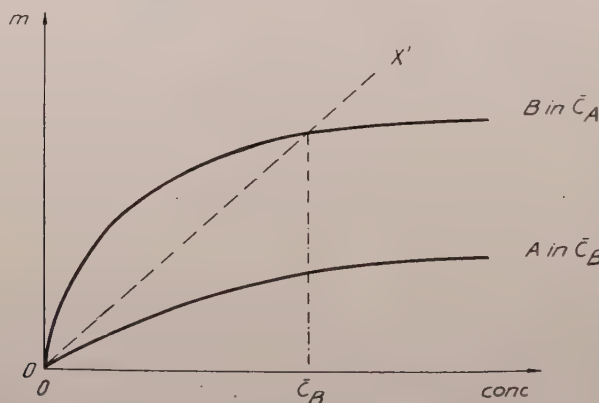


Fig. 3. Adsorption Isotherms of B in $\bar{C}_A$ and A in $\bar{C}_B$ (case I).

B . Clearly these principles may not be of very great practical value for each concentration of B will adjust the adsorption of A in a different way and it may be found that 'ideal' displacement can be brought about by one concentration of B but not by another (see later).

There is one case however in which these conditions can be treated mathematically — that of the Langmuir isotherms. The amounts m_A and m_B of A and B adsorbed in the presence of equilibrium concentrations $\bar{C}_A$ and $\bar{C}_B$ of A and B can be expressed as follows

$$m_A = \frac{a_A b_A \bar{C}_A}{1 + b_A \bar{C}_A + b_B \bar{C}_B} \quad m_B = \frac{a_B b_B \bar{C}_B}{1 + b_A \bar{C}_A + b_B \bar{C}_B} \quad (1)$$

where the constants a_A and b_A are the constants in the Langmuir isotherm for the substance A , and the respective constants for substance B are a_B and b_B

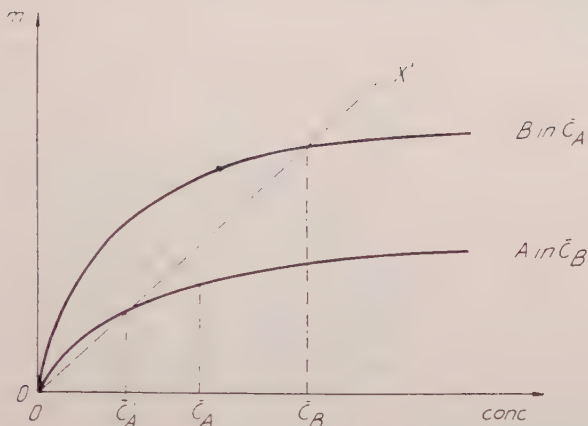


Fig. 4. Adsorption Isotherms of B in C_A and A in $\bar{C}_B$ (case II).

$$\text{whence } \frac{m_A}{\bar{C}_A} : \frac{m_B}{\bar{C}_B} = \frac{a_A b_A}{a_B b_B} < 1, \text{ as } B \text{ is more strongly adsorbed.} \quad (2)$$

The condition stated in equation (2) is that the isotherm of A should always lie below that of B for all concentration values.

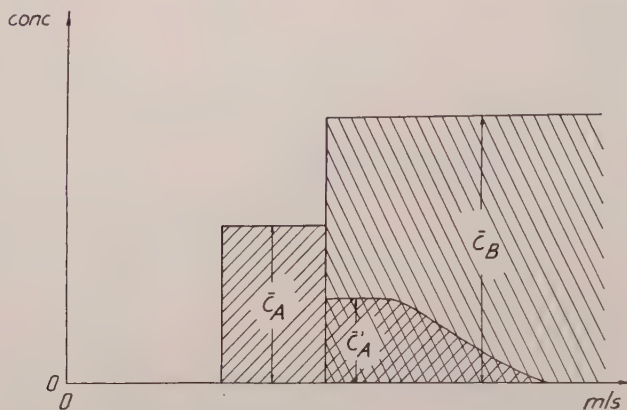
$$\frac{m_A}{\bar{C}_A} < \frac{m_B}{\bar{C}_B}. \quad (3)$$

Now $\frac{m_A}{\bar{C}_A}$ is the speed of movement of any concentration $\bar{C}_A$ and as it is less than $\frac{m_B}{\bar{C}_B}$ which is the slope of the speed line OX' through $\bar{C}_B$; the speed line OX' can not cross the isotherm of A in $\bar{C}_B$.

Thus if the isotherm of A and B are of the Langmuir type displacement must occur in an ideal fashion. This is in agreement with more mathematical treatments such as those proposed by GLUECKAUF (5).

Now it is well-known that the adsorption isotherms commonly experienced do not often conform to the simple Langmuir expression (6). It is therefore important to consider what will happen in those cases where other isotherms are recognised. In this discussion it will be assumed that the mathematical description of the isotherm is unknown.

In the simplest case, although the isotherms are not of the Langmuir type, the relationship between the adsorption of the two compounds in the presence of one another may still be such that 'ideal' displacement occurs at all concentrations of the compounds (Fig. 3). It is known however that such a simple relationship does not always occur. Thus at certain concentrations of B as a displacer, the depression of the A isotherm may not be as great as in Fig. 3 and it may well be that the speed line OX' drawn through the new value of $\bar{C}_B$ will cut the isotherm of A in this new concentration of B , Fig. 4. (This possibility is not present in the case of Langmuir isotherms.)

Fig. 5. Resulting displacement of *A* by *B* (see fig. 4).

Consider an experiment commencing with a fixed volume of a mixture of $\bar{C}_A$ and $\bar{C}_B$ applied to a column and followed by a developing solution of $\bar{C}_B$. *A* will move rapidly out in front of *B* until its concentration in the zone of *B* will fall to $\bar{C}'_A$, Fig. 4., when no more *A* will move to the front. The zone of pure *A* will now be at a concentration defined by the isotherms in pure solvent. (It is assumed that the isotherm of *B* in pure solvent and in the solution of $\bar{C}_A$ are little different.) If the system were at perfect equilibrium it would continue to travel in this way but due to the finite rates of flow and non-instantaneous equilibria present in column operations, the concentration of *A* in $\bar{C}_B$ will fall further, i.e. from $\bar{C}'_A$, and the regions occupied by *A* will begin to move more slowly than the front so that *A* will pass back away from the front. Obviously, as the concentration of *A* will continue to fall, if the column is long enough *A* will finally move as an elution peak in *B*. In some cases it is to be expected that diagrams of the type shown in Fig. 5 will be obtained. This is to be compared with the equilibrium diagrams of GLUECKAUF (7).

In the case given above, the development of a substance *A* by a compound *B* can yield either a displacement diagram or an elution diagram depending on the concentration of *B*. When this type of displacer is employed it will be termed a non-ideal displacer and a "non-ideal" displacement of *A* will be obtained in case II. Fig. 5. It will be seen later that this differentiation has some important applications.

The two cases of displacement which have been described do not include all possible cases of the relationship between the isotherms of two substances. However, from the description of these two cases it is easier to appreciate the action of one substance upon the adsorption of another.

A case which often occurs (see later) is that the isotherm of the displacer in pure solvent crosses that of the substance to be displaced, Fig. 6. In such a case it is clear that if the isotherm diagram for *A* in a given $\bar{C}_B$ and *B* in $\bar{C}_A$, is such that the *A* isotherm lies entirely below the speed line OX' , an 'ideal' displacement diagram can result but the displacement may well be concentration dependent — i.e. it may not obtain at other concentrations of *B* where the *A* isotherm is so little depressed that the line OX' cuts the *A* isotherm. Thus the displacer may not be 'ideal'. A similar argument will apply to the displacement of *B* by *A*. Nothing can be said

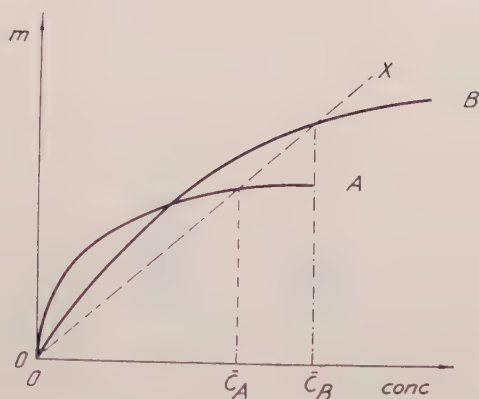


Fig. 6. Adsorption of *A* and *B* for the case of crossing isotherms.

for certain about the system however until the isotherms of *A* and *B* are known in all concentrations of *A* and *B*.

It is interesting to note that in such cases Fig. (6) and (4) if the concentration of *B* had been increased it is probable that an ideal displacement would have been obtained (Fig. 3 and I b) but that if it were much diminished little displacement would have been possible and *A* would be eluted in *B*. Thus for substances, having the isothermal relationships shown in Figs. 6 and 4, the technique which can be used for development is dependent on the concentrations employed. It is clear, furthermore, that the displacement technique is only differentiated from that of elution by the relationship between the adsorption isotherm of *A* in $\bar{c}_B$ and the speed line *OX'* through the point $\bar{c}_B$ on the isotherm of *B* in $\bar{c}_A$, Fig. 4. If *OX'* crosses the former isotherm the system never reaches a stationary state corresponding to displacement and its final state will be dependent upon the column length — characteristically of elution — and a type of elution diagram will result if the column is sufficiently long. If *OX'* does not cut the isotherm of *A* in $\bar{c}_B$ a displacement diagram will be obtained, which is representative of a stationary state independent of the column length.

It would appear therefore to be impossible to know which technique to attempt, displacement or elution, without a prolonged study of isotherms for a given system of substances.

However it is equally clear that all the above isotherm data can not be obtained in many cases and that it would be of great value if knowledge of the technique to be tried could be obtained from the isotherms in solvent alone without the data on the mixed isotherms. Such a procedure will be attempted here.

There are one or two further points to be mentioned before treating separation problems in this way.

The suitability of isotherms for displacement and elution

If an elution technique is employed in developing a chromatogram the zones of the substances will spread but their spreading will be dependent on the shapes of the isotherms in the eluting agent. It is well known that linear isotherms, which

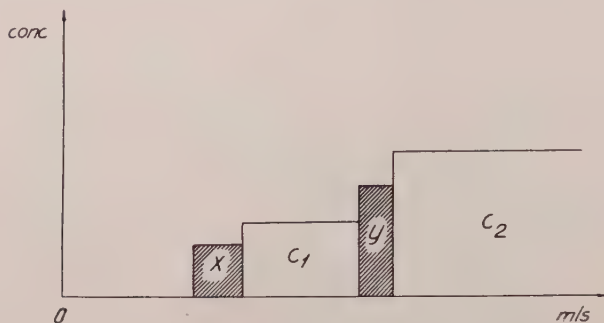


Fig. 7. An ideal carrier displacement (schematic).

yield symmetrically spreading elution peaks are to be preferred in elution analysis, as the curved isotherm produces an unsymmetrical peak resulting in tailing over large volumes of the solution (8). It is possible in separation experiments, in which elution is employed, that displacement of the compounds by one another occurs first and in such cases although two zones appear to overlap, they may not do so — a sharp front lying between them, in such a case only the 'tail' of the last substance on the column is lost.

In displacement analysis curved isotherms are essential if a series of sharp steps is to be obtained because the lowest concentrations must move with the lowest speed, and the speed line must cut the isotherms.

Thus as well as the relative shapes of the isotherms their absolute shape is important knowledge in deciding what technique can be used in a separation procedure.

Displacement analysis, as described above, still suffers from one disadvantage — the zones of the substances travel next to one another. Now as equilibrium is not exactly reached and furthermore as the speed line OX may make a small angle with the isotherm of A (Fig. 1 a) making the attainment of approximate equilibrium slow, sharp fronts in a displacement diagram must not be expected as a general rule. The compounds will not easily be completely separated in fact. Thus this simple displacement procedure will act as a preparative method rather than as one of separation.

A modification of the displacement method, named "carrier" displacement, overcomes this difficulty (2). The separation of two substances X and Y is brought about by using two displacers, one of which is intermediate between X and Y in adsorption strength and the other of which is greater than both of them. A displacement diagram as in Fig. 7 is then obtained.

It is no longer essential for the zonal boundaries to be perfectly sharp as the compounds to be separated travel free from one another. (The method can be used on a microscale which was impossible with simple displacement). The carriers can also be built up in a second way — by frontal analysis (2). In both cases however the conditions for ideal and non-ideal displacement will be those given above.

It is now possible to discuss the two separation techniques (1), carrier displacement analysis and (2) elution analysis, in terms of adsorption isotherms, which have been obtained recently.

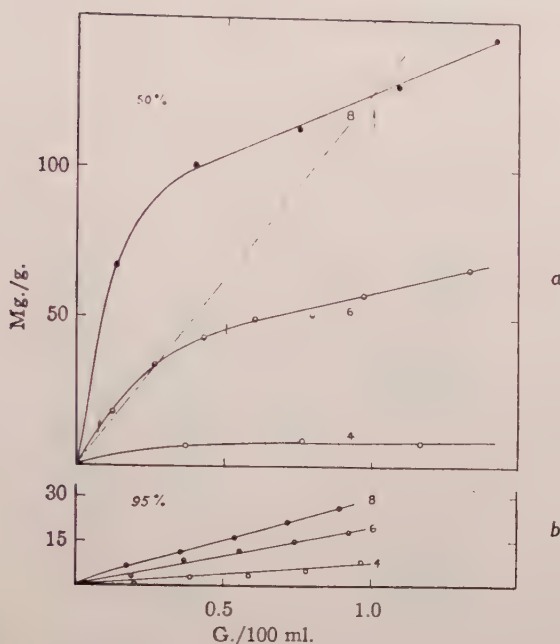


Fig. 8. Adsorption isotherms for Butyric (4), Caproic (6) and Caprylic (8) acids on Darco G. 60, charcoal from (a) 50 % and (b) 95 % ethanol.

Adsorption isotherms

The isotherms discussed here were all obtained by frontal analysis (ref [10]) experiments on Carboraffin Supra or Darco G 60 Charcoal and are dependent upon the adsorption process going to approximate equilibrium in a very short time as the flow rate in the column was maintained at 20 mls/hour. There is good evidence to show that equilibrium is roughly attained. The isotherms will reveal no information about the desorption processes.

The first set of isotherms are shown in Fig. 8 (a). They are the isotherms for the fatty acids in 50% alcohol. The isotherms are taken from a paper by HAGDAHL and HOLMAN (16) and it is to be noted that they show no tendency to cross. Furthermore it is possible to predict from the isotherms the displacement diagram that will be obtained. In other words it would appear that these substances displace one another ideally (9). Thus the first guide in the use of displacement is that it is probable that displacement of members of homologous series by one another is ideal. This is confirmed by observations in several other series of compounds. Thus the series of aliphatic alcohols, the isotherms of which are seen in Fig. 9, also displace one another ideally (11).

In Fig. 10 are given the isotherms of three sugars and Ephedrin taken from a paper by TISELIUS and HAHN (12). In this paper displacement experiments are shown in which the substances behave in an ideal fashion, the displacement occurring in the order and the manner to be expected. Thus compounds which are similar in character may also be expected to behave ideally in displacement of one another.

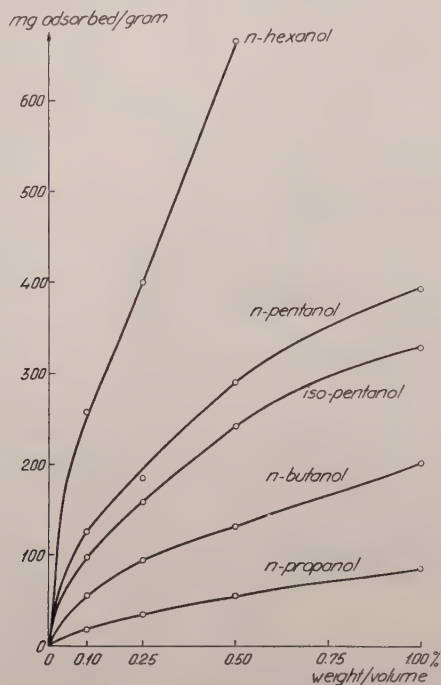


Fig. 9. Adsorption Isotherms of aliphatic alcohols on Carboraffin Supra Charcoal from water.

The latter statement is readily confirmed by the aminoacids, (13) the isotherms appear in Fig. 11, and for data on displacement analysis reference can be made to the many papers of Tiselius on this subject. The displacement in all these four cases has never been observed to be invalidated by changes in concentration.

Now in order to separate completely the individual sugars, fatty acids or amino acids a system of carriers must be built up (see above). But the carriers must not be too chemically and physically similar to the compounds to be separated as they must be removed finally from these substances. However, as can be seen from Fig. 12 and 13 as soon as the compounds become chemically or physically different the shapes of the adsorption isotherms change. In fact the isotherms of different homologous series may cross one another. A great number of isotherms have now been obtained and it is becoming increasingly clear that isotherms of substances which are different in chemical and physical properties have different shapes. In such cases 'ideal' displacement is no longer a general rule (see earlier).

Before this investigation was started however it was already known that "carrier" displacement analysis could be carried out. The alcohols had been used as carriers for the amino-acids with considerable success both in carrier displacement analysis and in carrier frontal analysis experiments (2) despite the fact that the isotherms cross. However, as the experiments were performed with micro quantities of the amino-acids it was not possible to distinguish between an elution peak of the amino acid in the front of a step of an alcohol and a step of the former compound occurring between two alcohol steps. In quite a number of experiments however the zones

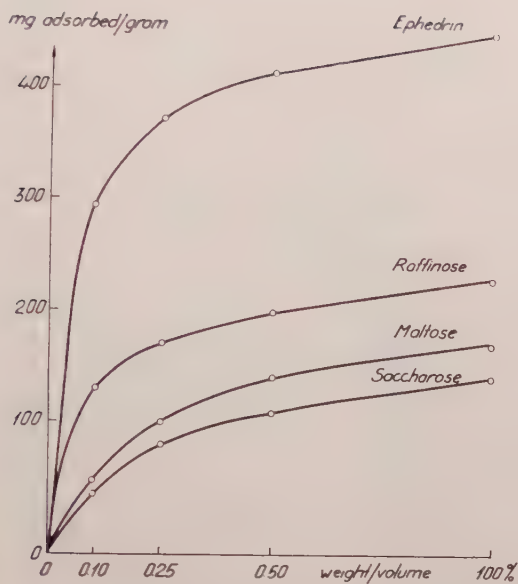


Fig. 10. Adsorption Isotherms of three sugars on Carboraffin C from water.

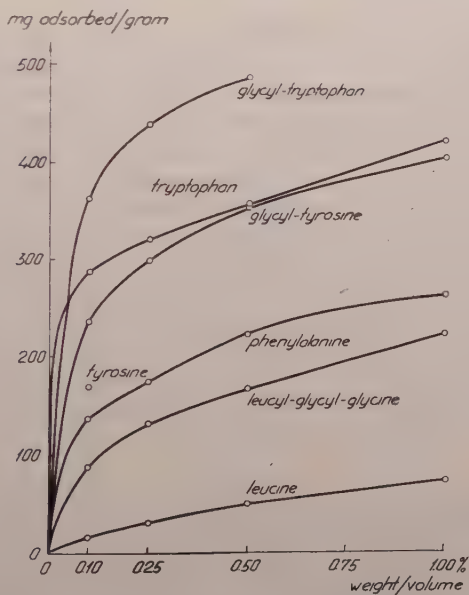


Fig. 11. Adsorption Isotherms of amino-acids and peptides on Carboraffin Supra from water.

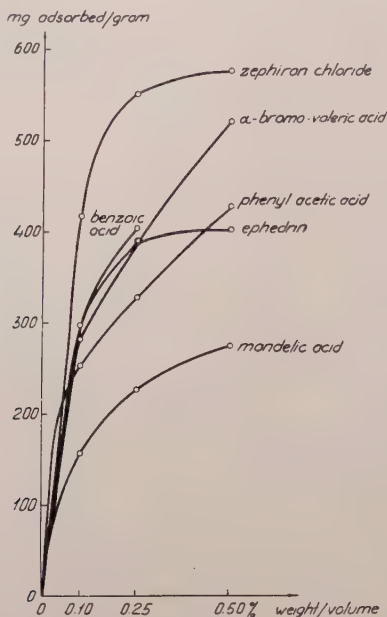


Fig. 12. A number of isotherms illustrating the difference of isotherm shape for different substances. The adsorption is on Carboraffin Supra and from water.

of the amino acids were not sharp but were spread in the zones of the alcohols and in these cases it was clear that elution of the aminoacids was occurring.

A second set of carrier experiments (14) and (15) is more informative. It shows that the displacement of fatty acids by fatty acid esters, methyl esters, does not yield the expected displacement diagram, Fig. 14. In fact a number of elution peaks, which tend to be asymmetrical, travel in the zones of the carriers. The shape of the peaks seems to indicate a tendency for the acids to spread into the zone in front of them but it is clear that a tailing into the zone behind also occurs. It is quite certain in fact that a stationary state in the column, has not been obtained. The observed result resembles that to be expected from the discussion of systems described in Fig. (4) and (5). (It may be pointed out that the separation in the above case may be improved by lengthening the steps of the carriers.) Again if the concentrations of the carriers were adjusted a displacement diagram might be obtained (see earlier discussion) but in an equilibrium system of carriers this is not normally possible although pretreatment of the column is a feasible method of adjustment.

HOLMAN (14) also observed that if ethyl esters of the acids or alkyl bromides were used as carriers (instead of the methyl esters) the acids spread throughout the zones of the carriers. Therefore the diagram obtained by using one homologous series to displace another did not yield an ideal displacement. It seems probable from our knowledge of the above isotherms and the discussion which preceded it, that the different types of adsorption isotherms for the different substances reduce the possibility of using such a carrier system in an ideal fashion but it may still be

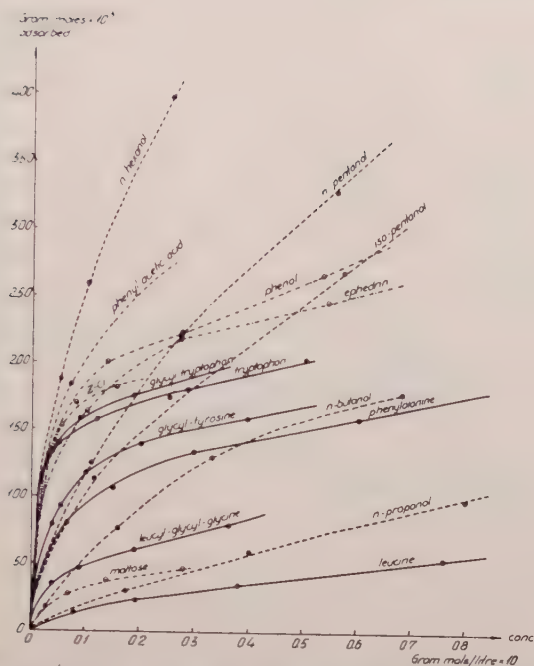


Fig. 13. Collected isotherms for a number of compounds. The adsorption is on Carboraffin Supra and from water. Z-Cl in the figure stands for Zephiran Chloride.

possible to use it in a separation, eluting the compounds as in Fig. 14, i.e. as in the case described by HOLMAN.

Unfortunately it is impossible to predict the concentrations that should be used in the various steps in order to affect a separation. To solve this difficulty we must first overcome another problem. In the above type of carrier system it is suggested that elution, or non-ideal displacement in some cases, is occurring as opposed to "ideal" displacement. Now in an ideal displacement experiment equilibrium is rapidly achieved but in elution, as pointed out above, a stationary state is not obtained and equilibrium is often slow. Before using the above carriers the rate of approach to equilibrium must be considerably increased. Now in general it is the desorption processes for strongly adsorbed substances which do not go to equilibrium rapidly enough. Two ways of effecting a change in this have been attempted.

- (1) Change of solvent either by
 - (a) adding a second solvent
 - (b) changing the pH.
- (2) Partial saturation of the adsorbent.
- [(3) Change of temperature. No additional data will be presented under this heading but reference can be made to (9) and (23).]

The effect of these changes will again be discussed with reference to the isotherms. The fatty acid isotherms have been investigated by HAGDAHL and HOLMAN (9) in ethyl alcohol and aqueous solutions of ethyl alcohol. The change in solubility brings about a marked change in the curvature of the isotherms (Fig. 8 a and 8 b)

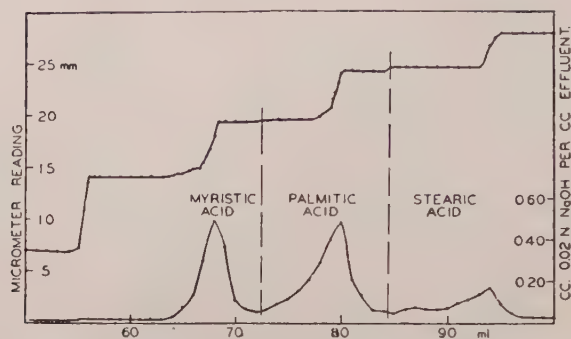


Fig. 14. Carrier displacement separation of three fatty acids in a carrier system of methyl esters of the acids (compare fig. 7).

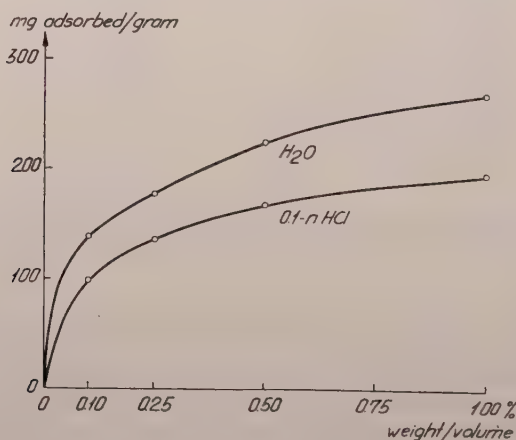


Fig. 15. The effect of 0.1 *n* HCl on the adsorption of phenylalanine.

and a marked change in the ease of establishing equilibrium. Unfortunately such a change also changes the adsorbent surface by adsorption of ethyl alcohol so that the solubility factor is not easily discussed separately from that of the small effects on adsorption, but in this case the solubility change is very large and must exert considerable influence (see paper by HAGDAHL and HOLMAN). Now consider the other methods of adjusting the equilibrium: — (1 b). The effect of pH changes on adsorption is shown in Fig. 15. for the isotherms of phenylalanine. At the same time as the isotherm was depressed, the desorption equilibria are improved but the improvements were observed to be too small still for an approximate equilibrium to exist in elution type experiments.

Pretreatment of the adsorbent (17) and (18)

Pretreatment of an adsorbent not only affects the equilibrium but also adjusts the surface of the adsorbent. Thus many new features of importance can be observed

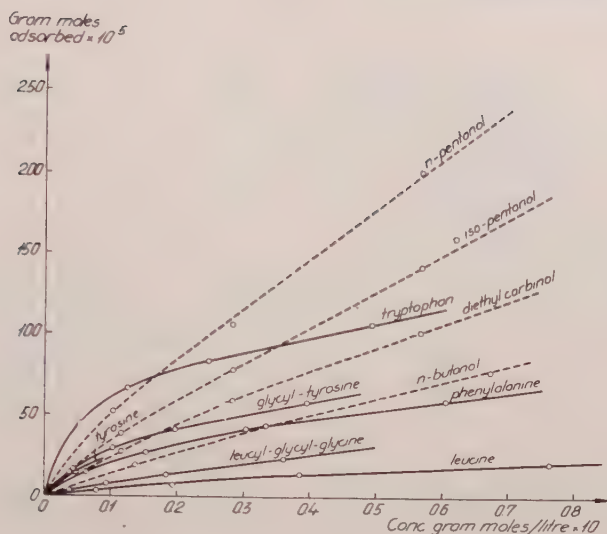


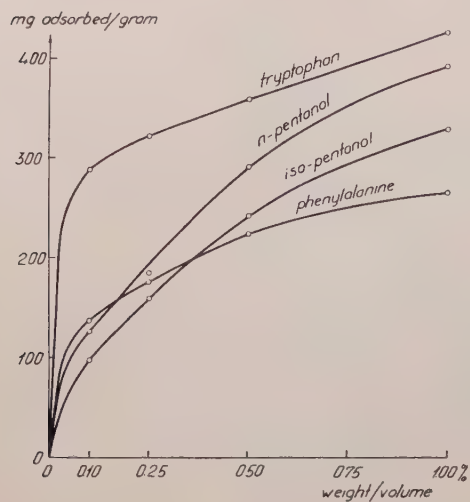
Fig. 16. Adsorption Isotherms of alcohols, amino acids and peptides on Carboraffin Supra pretreated with 0.1% hexanol from an aqueous solution of 0.1% hexanol in water.

on studying the adsorption isotherms in the presence of saturators. While tackling the question of the equilibrium an account will be given of these features — firstly with respect to a single saturator (hexanol) and then with reference to different saturators.

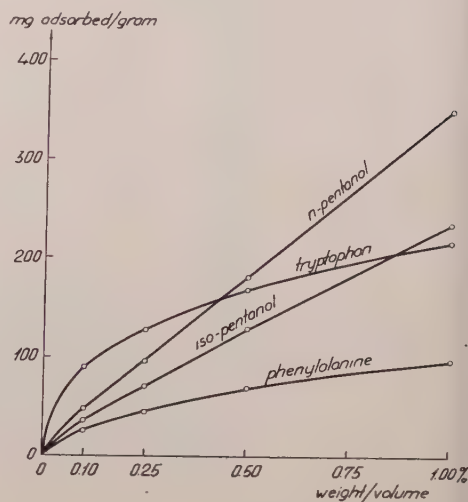
The following experiments were now carried out in order to observe the effect of a saturator upon adsorption. The carbon adsorbent was pretreated with hexanol in the following manner: — a 0.1% solution of hexanol was passed down a column of Carboraffin Supra until the column was saturated. The solution of substances, the isotherms of which were to be determined, were made up in 0.1% hexanol, and the usual frontal analysis procedure adopted. The isotherms are given in figure 16, for the amino acids and the alcohols. Clearly the adsorption of the amino acids is much more depressed than that of the alcohols by the saturation (Fig. 16).

A second clear point is that all the isotherms become more nearly linear. They remain, of course, more suitable for displacement analysis than for elution analysis as they are still curved. Maybe on further increasing the saturation, linear isotherms would be obtained (see later).

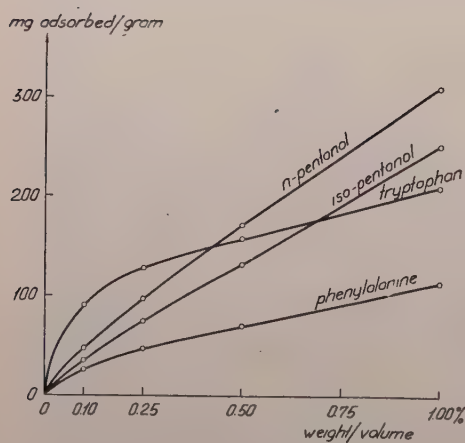
The third point of interest is that the difference between some members of the amino-acid series is greatly enhanced. The isotherms for amino-acids with less adsorption than tryptophan are relatively more depressed than tryptophan and glycyltryptophan. (This is clearly seen in the case of glycyltyrosine.) The probable cause of this discriminating effect is best seen when the effect of hexanol as a saturator is compared with that of other saturators — Fig. 17. The case of 0.1% *n*-pentanol is particularly interesting as the difference in adsorption between tryptophan and phenylalanine is enormously enhanced as compared with untreated carbon. From the fact that *n*-pentanol can displace phenylalanine rather well (possibly as an "ideal" displacer) and tryptophan not at all it would appear that when a substance which has adsorption properties lying between two other compounds is used as a



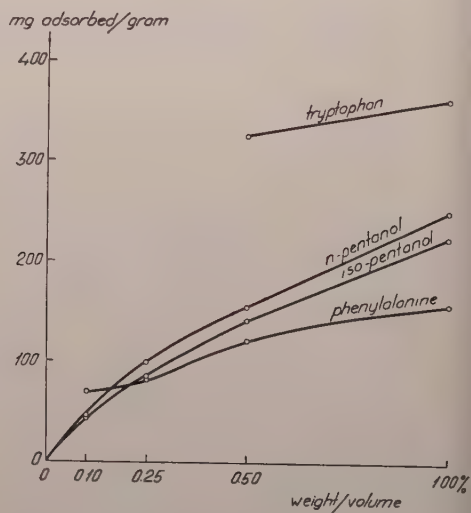
a



b



c



d

Fig. 17. The adsorption isotherms of two amino acids and two alcohols in the presence of different saturators.

- | | |
|------------------|----------------------------|
| (a) water | (c) 0.1% 2-methyl pentanol |
| (b) 0.1% hexanol | (d) 0.1% n-pentanol |

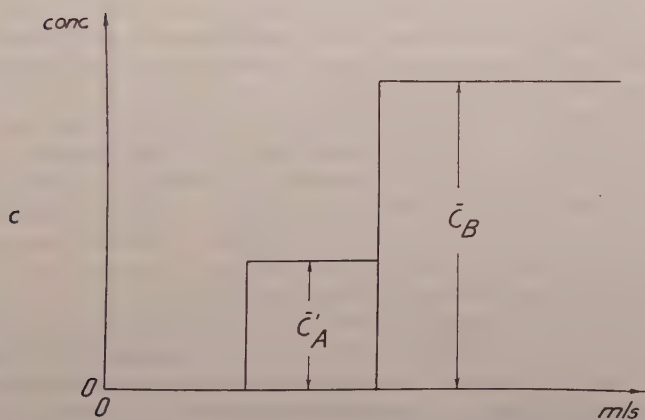
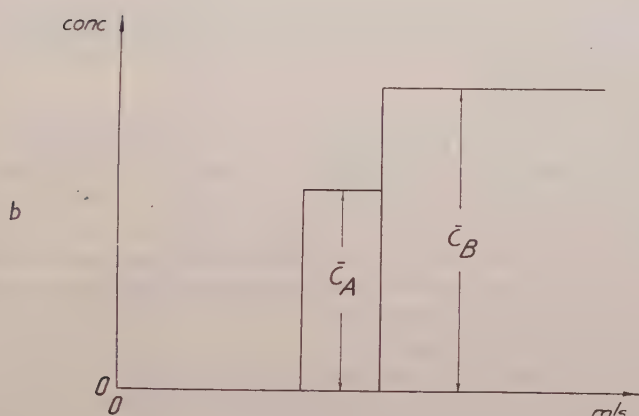
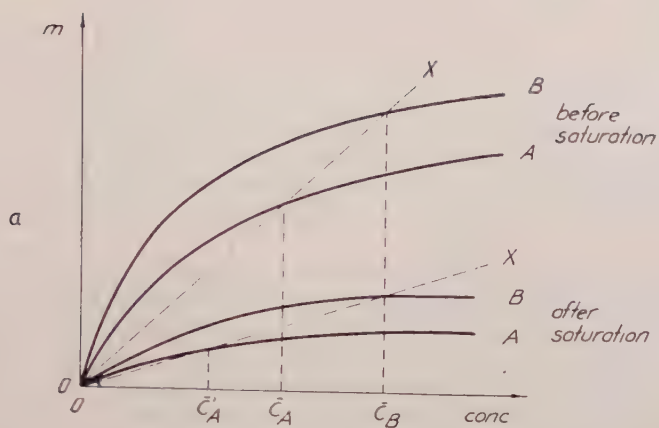


Fig. 18. (a) Adsorption isotherms of two substances A and B before and after saturation of the adsorbent. The displacement in the former case is shown in fig. 18 (b) and in the latter in fig. 18 (c).

saturator it will effect the adsorption of one of the substances to a much greater extent than the other. This reflects very favourably to the advantage of an "ideal" carrier displacement technique where displacers are deliberately chosen to fit between the substances to be separated. Hexanol probably has a much greater effect upon glycyl-tyrosine than upon tryptophan adsorption for the simple reason that it is not an "ideal" displacer for tryptophan but must be much more nearly so for glycyl-tyrosine. (Tryptophan it is known, does displace some of the hexanol used as a saturator.)

Another point which must not be overlooked in the discussion of saturators is the effect upon the separation of substances the isotherms of which appear to be equally depressed (19). In Fig. 18 (a) it is seen that a concentration $\bar{C}_B$ of substance *B* will displace *A* at a concentration $\bar{C}_A$ before saturation but a concentration $\bar{C}'_A$ ($< \bar{C}_A$) after saturation. The two displacement diagrams are shown Fig. 18 b and 18 c. The chance of good separation is greatly enhanced in the latter case; although the isotherms are closer together the relative step heights are better suited for separation. This is clearly in favour of pretreatment of the carbon. Caution must be used however in applying this idea, as the time taken to reach equilibrium is also increased the lower the concentrations of the steps and the more nearly linear the isotherms become.

As far as the equilibrium is concerned the desorption process, (which is probably closer to equilibrium the further the isotherm is from the ordinate axis, the weaker the adsorption,) will clearly be improved after saturation. This has been observed in a great number of experiments. Using these observations on the effect of pretreatment of the adsorbent it is now possible to return to the discussion of "non-ideal" and "ideal" displacement and finally to their application to separations (see earlier pages 9, 10) in the case of strongly adsorbed substances which are approximately at equilibrium.

Ideal and non-ideal displacement

From the isotherms in Fig. 16 it would appear that isopentanol could displace phenylalanine and tyrosine in the presence of hexanol as a saturator. The saturator is essential for otherwise the results obtained might be only non-equilibrium phenomena. There are two ways of examining the nature of such a displacement.

(1) If a substance acts as an "ideal" displacer then, if it is now used at the same concentration as a saturator for the adsorbent, the substance which was displaced, should travel as a free elution peak and should have little adsorption.

(2) If the concentration of an "ideal" displacer is reduced the substance should still be displaced in front of the displacer zone, both substances travelling as zones of lower concentration. The compound to be displaced can *never* travel behind the front of an "ideal" displacer (see page 8).

The actual test experiments were carried out as follows:

To a treated column (0.1% hexanol) 1.0 ml. of 0.1% Phenylalanine + 0.1% tyrosine (in 0.1% hexanol) was added. The solution was then developed with a 0.5% isopentanol solution in 0.1% hexanol when a displacement diagram was obtained, fig. 19 (a). The experiment was now repeated saturating the column with increasing concentrations of the displacer and displacing with isopentanol solutions, Fig. 19 b, c, d. In the last case saturation with 0.5% solution of the displacer failed to move the amino acids as elution peaks. In fact, considering the large quantities of isopentanol

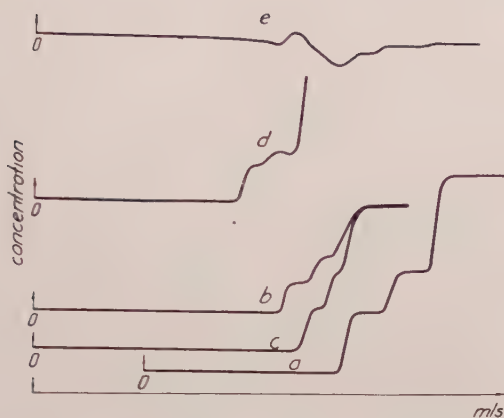


Fig. 19. The displacement of phenylalanine and tyrosine on carbon saturated with 0.1% hexanol and varying amounts of isopentanol as saturator (I) and as displacer (II).

	I	II
(a)	—	0.5 %
(b)	0.2 %	0.3 %
(c)	0.1 %	0.4 %
(d)	0.5 %	0.5 %
(e)	0.5 %	elution experiment

taken up by the column, remarkably little effect was seen, and certainly there is no tendency for the compounds to move as free peaks. A final test experiment was made on a column treated with 0.1% hexanol plus 0.5% isopentanol by adding the amino-acids and then developing with the same solution as that used for saturation. This is a simple elution experiment. Fig. 19 e shows the diagram obtained. It indicates that the amino-acids displaced some of the isopentanol and then travelled in a kind of trap — moving at the same speed as the new front of isopentanol. Clearly isopentanol is not an ideal displacer for these aminoacids. The explanation for the above experimental results is that given above. In some concentrations of isopentanol, phenylalanine and tyrosine are so weakly adsorbed that they travel faster than the concentration of the displacer but in lower concentrations of isopentanol this is no longer true and the speed line OX' crosses the isotherms of the amino-acids as in Fig. 4. It is clear then that the isopentanol can act as a good displacer of the “non-ideal” type. Experiments were also attempted with very low concentration of isopentanol as a displacer. It was observed then that the amino-acids were no longer displaced but travelled as elution peaks behind the front of the isopentanol. Similar experiments in which diethylcarbinol (in low concentration) was tested as a “non-ideal” displacer and in this case acted as an eluting agent, did separate, to a very considerable extent, the two amino-acids. (The isotherm of diethyl carbinol crosses that of tyrosine and that of phenylalanine.)

An attempt was also made to use diethyl carbinol as a carrier between phenylalanine and tyrosine. Displacement experiments Fig. 20 had showed that isopentanol displaced tyrosine, diethyl carbinol, and phenylalanine and from the step heights (as concentrations) in the displacement diagram it was deduced that the three compounds were adsorbed increasingly in the order tyrosine > diethyl carbinol >

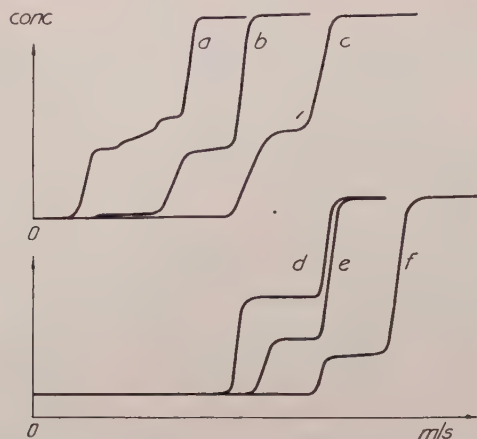


Fig. 20. Illustration of the attempted carrier displacement experiments for the separation of phenylalanine and tyrosine by alcohols.

- (a) Attempted carrier displacement of the two aminoacids by diethyl carbinol and isopentanol.
- (b) Attempted displacement of phenylalanine and diethyl carbinol by isopentanol.
- (c) Attempted displacement of tyrosine and diethyl carbinol by isopentanol.
- (d) Displacement of tyrosine by isopentanol.
- (e) Displacement of diethylcarbinol by isopentanol.
- (f) Displacement of phenylalanine by isopentanol.

phenylalanine. This meant that it was possible that the two amino acids could be separated by diethyl carbinol acting as a carrier. In Fig. 7 X and Y would be the proposed amino-acid positions and C_1 and C_2 the carriers diethyl carbinol and isopentanol. Three experiments were tried.

(a) The displacement of phenylalanine and diethyl carbinol together by isopentanol. Fig. 20 (b).

(b) The displacement of tyrosine and diethyl carbinol together by isopentanol. Fig. 20 (c).

(c) The above carrier experiment. Fig. 20 (a).

All three experiments failed. There can be no doubt that only slight mutual displacement occurred. Clearly, under these conditions, the alcohol is unsuitable as a carrier, although it acts to some degree as a non-ideal displacer.

A number of other experiments using tryptophan or phenylalanine as the substance to be examined and other alcohols as the developer showed the same effect. With a much lower alcohol such as butanol however the amino-acid travelled as an elution peak at the front of the alcohol zone and no displacement diagram could be obtained.

The series of experiments with isopentanol should be contrasted with the series using different concentrations of hexanol (Fig. 21) or of phenylacetic acid as a saturator when the movement of the amino acids as free peaks in front of the displacer showed that these two substances acted as "ideal" displacers. The experimental evidence confirms then in every respect the theoretical predictions. There is a decided difference between an ideal and non-ideal displacer.

From the above it is clear that a "non-ideal" displacer at low concentration becomes an eluting agent. That is, it can act either as an eluting agent or as a displacer.

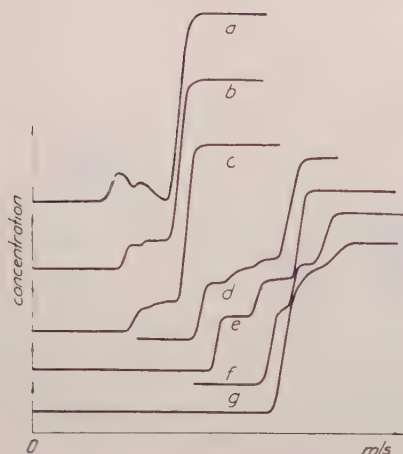


Fig. 21. Displacement of phenylalanine and Tyrosine in the presence of various concentrations of hexanol as a saturator and using 0.5 % isopentanol as a displacer.

(a) 0.2 % hexanol as saturator (free peaks)	(e) 0.10 % hexanol as saturator
(b) 0.18 % » » »	(f) 0.08 % » » »
(c) 0.15 % » » »	(g) 0.05 % » » »
(d) 0.12 % » » »	

Thus both elution and displacement are possible with one substance providing its concentration is correctly chosen for the required technique.

What is perhaps more important is that a given concentration of a substance may act as a displacer for one compound but will only elute another. Thus if the conditions are correctly chosen and the column made long enough separation must be achieved. This is the principle behind many carrier separations.

Methods of separation

It is now clear that 'carrier' separations can be carried out but that the correct choice of the carrier and its concentration will be a matter of considerable difficulty. Thus it may often be more profitable to examine possible methods of separation by elution as it is clear that a saturator will eliminate non-equilibrium difficulties. In the first place there is a method of using an ideal displacer in elution type experiments.

TISELIUS and HAHN (12) suggested that if two substances *A* and *B* were ideally displaced by a third substance *C* then by pretreating the column with a given concentration of *C*, *A*, which is less adsorbed than *B*, could be made to move as an elution peak whilst *B* was displaced by applying continuously a still higher concentration of *C*. In this way complete separation of *A* from *B* could be achieved. Now this was only used to separate one substance from several others but if it were possible to build up a series of portions of a column in which the displacer concentration decreased stepwise from the top, different substances should travel as elution peaks or displaced zones in different regions of the column (Fig. 22). The only difficulty is the practical one of setting up such a step-wise series of displacer

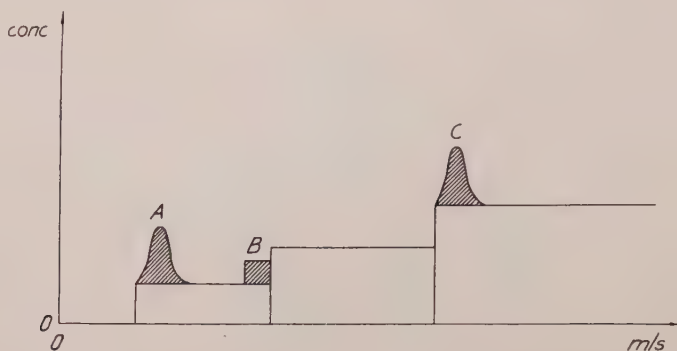


Fig. 22. Schematic diagram of mixed ideal and non-ideal carrier displacement of three compounds, B is ideally displaced.

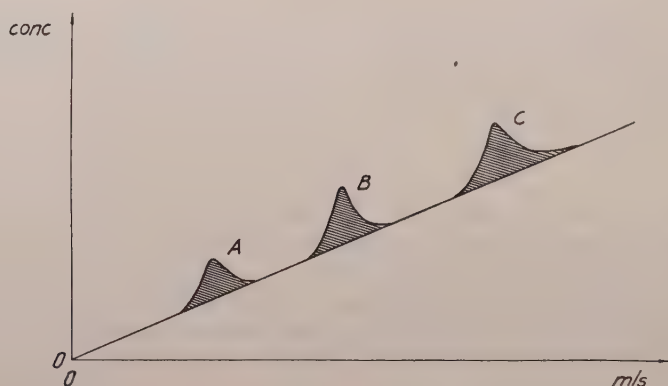


Fig. 23. The resulting diagram from the use of a gradient of displacer concentration to separate three compounds.

concentrations before applying the substances and then to maintain the steps' movement so that they do not shorten too much. It may be that the best solution for such a procedure is to set up a gradient of displacer concentration in a column with the substances moving as free peaks (Fig. 23). This will be discussed elsewhere.

The problem of setting up a series of steps or a gradient of different concentrations which moves without shortening, depends on making the isotherm of the displacer linear. It is also an advantage if the isotherms of the examined substances are made more linear as the elution peaks will no longer tail. The third important feature is that equilibrium should be rapidly obtained. Untreated carbon does not readily satisfy these considerations (see above) and a further study was made therefore of variations in methods of treating carbon and of the effect of this treatment upon the isotherms. Once again phenylalanine and tryptophan — substances known to have strong adsorption and slow desorption on carbon — were used as test compounds. The isotherms are shown in Figs. 24 and 25.

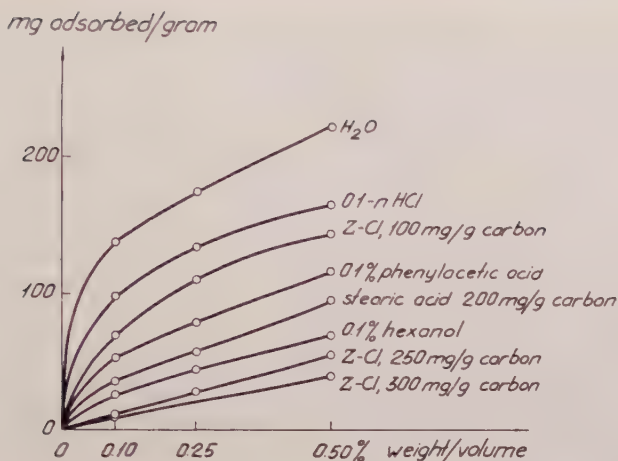


Fig. 24. Adsorption Isotherms of phenylalanine on Carboraffin Supra Charcoal in the presence of different saturators.

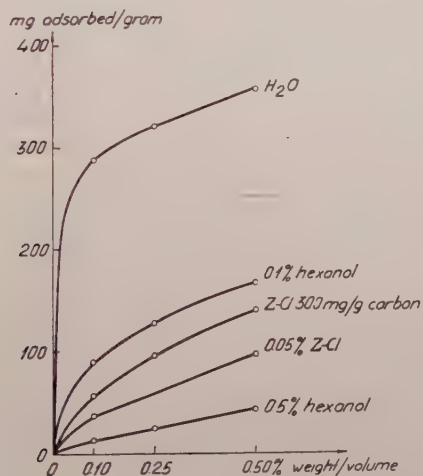


Fig. 25. Adsorption Isotherms for tryptophan on Carboraffin Supra Charcoal in the presence of different saturators.

The points which are immediately clear are: —

(1) All the saturators have a qualitatively similar effect although very different concentrations of different substances are required to produce the same quantitative effect.

(2) The greater the saturator concentration (as amount taken up by the carbon), the greater this effect.

(3) It is not certain until the isotherms have been very considerably depressed, that desorption equilibrium will be readily established, as adsorption is very strong at low concentrations.

The first feature is in some way unexpected as it might have been anticipated that some specific interactions would be possible after such treatments. This has not appeared in our results but the possibility remains. Again despite the fact that the substances used for pretreatment have very different isotherms their effect is very similar. Zephiran chloride has a curved isotherm whereas hexanol has a linear isotherm, until a very high concentration, yet they produce, as saturators, the same effect on the isotherm of phenylalanine and tryptophan respectively.

It should be observed that the methods of pretreatment were not always the same, and that the method of carrying out the experimental determination of the isotherms differs from one saturator to another. Stearic acid was applied by adding to a known weight of Carbon, a known weight of Stearic acid in alcohol and then shaking the mixture for 48 hours. The alcohol was then diluted with water so that all the stearic acid was taken up. The Carbon was filtered off, washed with water and used directly with aqueous solutions of the aminoacids. The process assumes that as the stearic acid is insoluble in water it will not interfere with the adsorption/desorption processes which are used for the isotherm determination. This was not true in the case of hexanol (as was mentioned above) and the method of using this saturator was as described before. Zephiran Chloride was also employed in this manner, i.e. so that a constant concentration — the equilibrium concentration for a given amount of adsorption of the saturator, was maintained in the solution above the Carbon. The differences in the saturation technique produced no differences in the amino-acid isotherms but this may not be true in other cases.

Returning to the discussion of the step-wise increase in displacer concentration and the need for a method for keeping different concentrations moving at the same speed in the column, it is clear from the above discussion, that all saturators are similar and therefore that a low concentration of the "ideal" displacer will be a good saturator for the substances to be examined.

It is fortunate too that after the application of a low concentration of the 'ideal' displacer to the column the isotherm for additional amounts of displacer is nearly linear so that the different concentrations automatically move with somewhat similar speeds. The technique can now be tested. It is really a system of "carriers" (the different concentrations of the displacer) which are applied to the column before the substances to be examined. (In the original carrier system the "ideal" and sometimes the "non-ideal" carriers were applied (all together as a mixture) after the substances). The use of such a displacer gradient will be discussed elsewhere.

The more usual elution technique described at the beginning of this paper is only applicable to substances which have linear isotherms. This has been modified by employing step-wise changes in eluting agent concentrations such as in the application of the Trappe series of eluting agents to the separation of the sterols (19). In such a case substances which have curved isotherms are often eluted at the beginning of a new step — a type of non-ideal displacement occurs. The difficulties which occur are the spreading of zones and the slow equilibria. It is now known that the latter can be readily overcome by the use of a saturator. Furthermore it has been recently found in this laboratory that the technique can be vastly improved by using a continuously increasing concentration of the eluting agents instead of step-wise increments in concentration. (21) Data on this new technique will appear in several subsequent publications from this laboratory as the method has been shown to be very powerful in the separation of sugars (20), fatty acids, amino-acids, and peptides (22).

Thus the immediate result of this work is that displacement analysis and elution analysis are brought together in a common description. This has resulted in the clarification of some of the fundamental processes behind adsorption and in a better understanding of the utilisation of the techniques now available. It has also brought forward some suggestions as to new techniques which have now been applied in chromatography with very considerable success.

The data have been entirely restricted to observations on carbon but are in the process of being tested further with other adsorbents.

Partition

During the course of this study other points of interest have arisen. On increasing the saturation of carbon with hexanol from 0.1% to 0.5% the adsorption of the amino acids decreases but that of the alcohols remains somewhat constant and even tends to increase from 0.3% to 0.5% saturation, figs. 26 and 27. Again, the

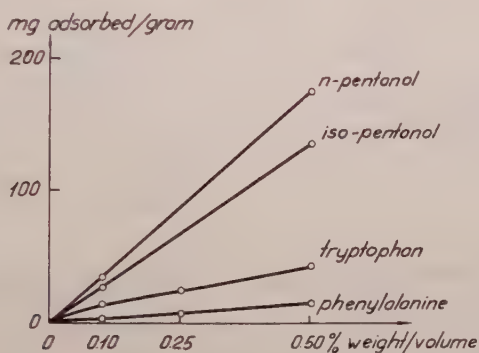


Fig. 26. Adsorption Isotherms for two amino acids and two alcohols on Carboraffin Supra Charcoal in the presence of 0.5% hexanol as a saturator.

adsorption isotherm for isopentanol on 0.1% hexanol treated carbon crosses that of the isotherm of isopentanol on untreated carbon. Both these facts indicate that a cooperative adsorption occurs. This "co-operative adsorption" is of great interest with regard to "partition".

Partition and adsorption are often separated in a somewhat artificial manner. If adsorption occurs in a monolayer the adsorption isotherm may be of the Langmuir type but when secondary (multilayer) adsorption occurs the isotherms often show no definite maximum and sometimes approximate to linearity. This type of adsorption can be looked upon as the formation of a surface film. It is only necessary now to consider the substance adsorbed from the solvent as a second component in a two component system, to have a complete partition system. The adsorbent is the support, the solvent containing the solute is one phase and the adsorbed solute is the second phase. In this way a strong adsorbent can be used to act as a support for a phase in partition experiments and it is no longer necessary to use mutually saturated phases as the adsorption controls the phase compositions. This mechanism may be operating in many well established partition systems.

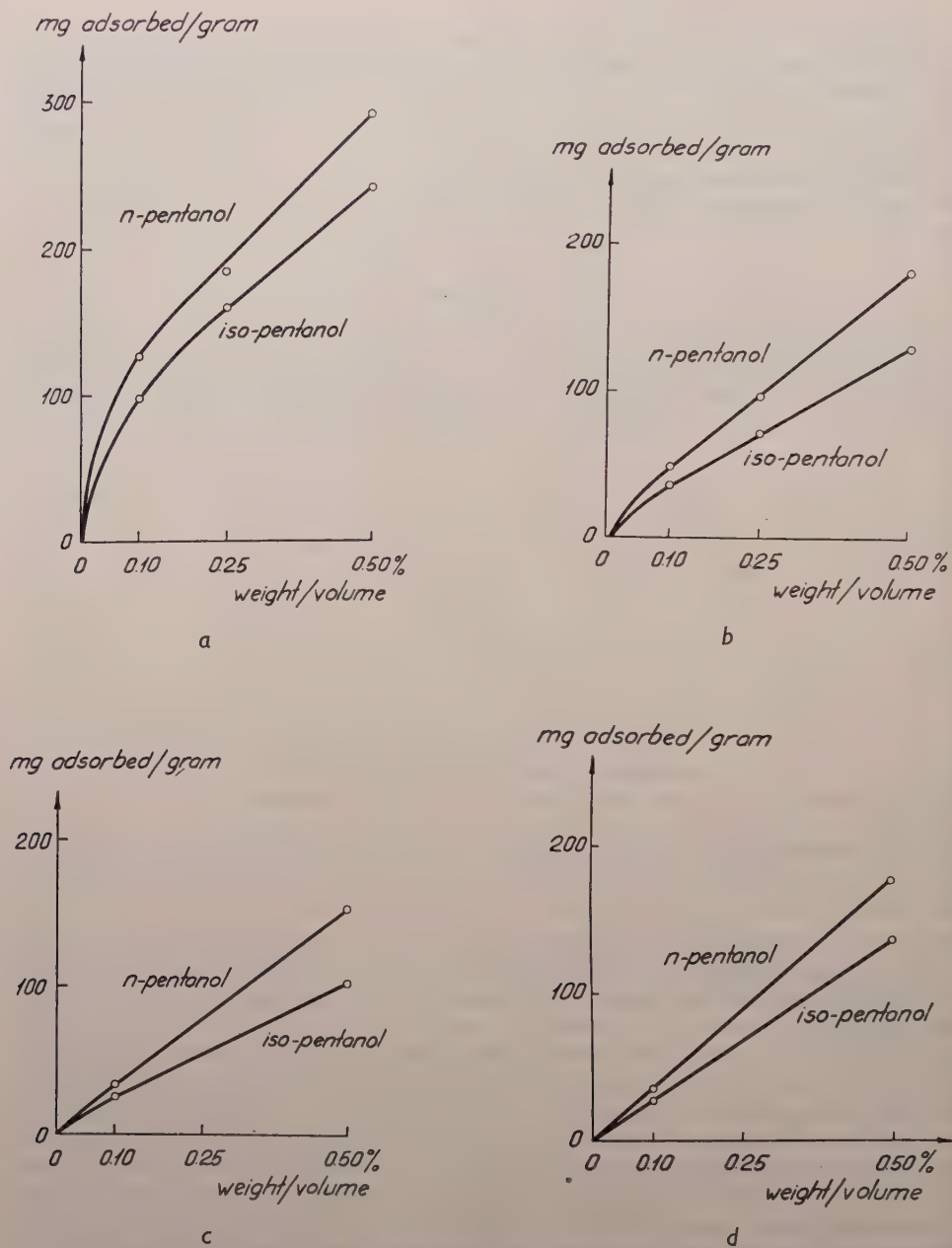


Fig. 27. Adsorption Isotherms for two alcohols on Carboraffin Supra Charcoal in the presence of different concentrations of hexanol as a saturator.

- | | |
|-------------------|-------------------|
| (a) pure water | (c) 0.3 % hexanol |
| (b) 0.1 % hexanol | (d) 0.5 % hexanol |

Compounds can now be examined in such a partition system but they should not be able to displace the substance *A* which acts as the stationary phase — they should not be more strongly adsorbed on the Carbon than *A*, i.e. certainly, if the solution of *A* is a very weak one. If the solution is very concentrated a substance which is adsorbed more strongly will not displace *A* from the carbon, as the eluting power of *A* will be too great. Clearly the eluting power only interferes with adsorption and not with partition. The general case in partition work is to use highly concentrated, often saturated, solutions of weakly adsorbed substances — and although adsorption is a part of such a process its function may well be small. Clearly, though, in all partition systems the support is an adsorbent for the stationary phase and in all adsorption experiments the adsorbent is a support for the solvent. In the case of adsorption carried out with mixed solvents the surface film of adsorbed solvent will always differ in composition from that of the bulk solvent. Thus a partition system is unavoidably in existence.

In many experiments it is not possible to say which feature controls separation — i.e. partition or adsorption.

Already we have performed some experiments illustrating the separation of organic acids and alcohols on carbon treated with hexanol. These experiments would seem to confirm the ideas outlined above. Thus partition and adsorption are being brought into a common treatment.

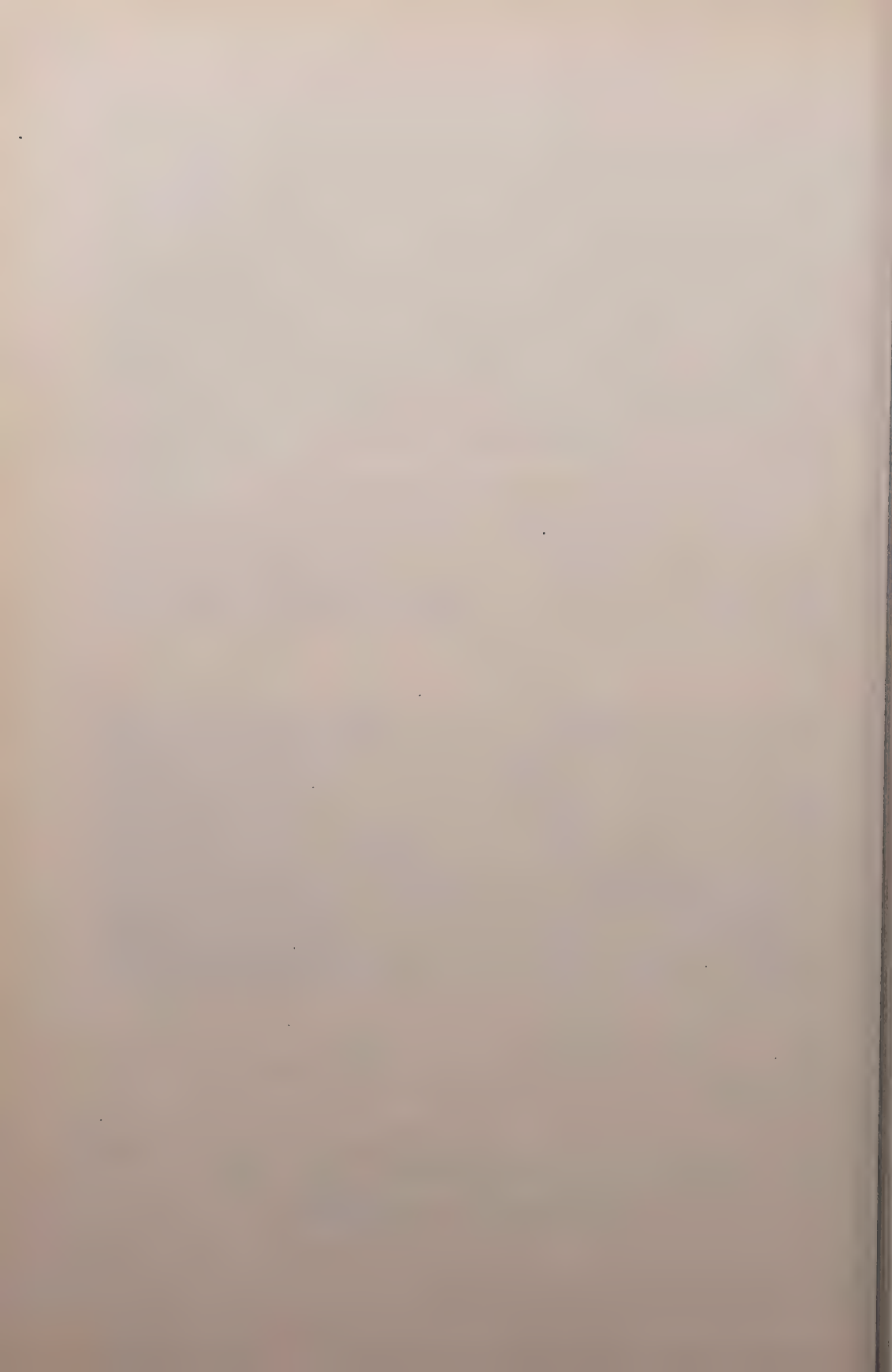
This work has been financially supported by The Swedish National Science Research Council. One of us (R.J.P.W.) would like to express his thanks to Rotary International for a Fellowship which has enabled him to take part in this work.

Institute of Biochemistry, Uppsala.

REFERENCES. 1. **A. Tiselius**. Arkiv Kemi Mineral. Geol. *B* 14, No. 22, 1940. **S. Claesson** Arkiv Kemi Mineral. Geol. *A* 23, No. 1, 1946. — 2. **A. Tiselius** and **L. Hagdahl**. Acta Chem. Scand. 4, 394, 1950. — 3. **A. J. P. Martin** and **R. L. M. Synge**. Biochem. J. 35, 1358, 1941. — 4. **A. Tiselius**. Arkiv Kemi Mineral. Geol. *A* 16, No. 18, 1943. — 5. **E. Glueckauf**. Discussions Faraday Society No. 7, 1949. — 6. **H. G. Cassidy** (Book) "Adsorption and Chromatography". Interscience 1951, page 68. — 7. **E. Glueckauf**, ref. (5). idem J. C. S. 1302, 1947. — 8. **D. De Vault**. J. A. C. S. 65, 532, 1943. — 9. **L. Hagdahl** and **R. T. Holman**. J. Biol. Chem. 182, 421, 1950. — 10. See ref. 6, page 224. — 11. **S. Claesson**, Arkiv Kemi, Mineral. Geol. *A* 23, No. 1, 1946. — 12. **A. Tiselius** and **L. Hahn**. Kolloid Zeitschrift 105, 3, 1943. — 13. **A. Tiselius** and **L. Hagdahl**, unpublished data. — 14. **R. T. Holman** J. A. C. S. 73, 1261, 1951. — 15. **R. T. Holman** J. A. C. S. (in press). — 16. **L. Hagdahl** and **R. T. Holman**. J. A. C. S. 72, 701, 1950. — 17. **D. E. Weiss**. Discussions Faraday Society No. 7, 1949. — 18. **R. L. M. Synge** and **A. Tiselius**. Acta Chem. Scand. 3, 231, 1949. — 19. **W. Trappe**. Biochem. Z. 305, 150, 1940. — 20. **R. Alm** and **A. Tiselius**, to be published shortly. — 21. **R. Alm**, **R. J. P. Williams** and **A. Tiselius**, to be published shortly. — 22. **L. Hagdahl**, **R. J. P. Williams** and **A. Tiselius**, to be published shortly. — 23. **L. Hough**, **J. K. N. Jones** and **W. H. Wadman**. J. C. S. 1702, 1950.

Tryckt den 26 mars 1952

Uppsala 1952. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB



The changes in catalase and cytochrome oxidase activity in developing sea urchin eggs

By HARALD F. DEUTSCH¹ and TRYGGVE GUSTAFSON

With 7 figures in the text

Introduction

The overall respiration of the egg of the sea urchin has been the subject of numerous investigations. More recently, studies have been directed toward a determination of the activity of specific enzymes as a function of the different stages of development from the unfertilized egg up to the pluteus stage. The activity changes of choline-esterase (1) and alkaline phosphatase (8) and a series of other enzymes (9) in such systems have shown interesting relationships to the morphological development.

In extensional work of this nature, the present investigation was directed toward a study of the activity of the catalase and cytochrome oxidase systems. These studies show that the apparent activities of these enzymes show marked changes during the first 36 hours of development. The measured activity of a given enzyme in a lysate of sea urchin eggs is, however, not necessarily a function of an increase or decrease in the absolute amount of that enzyme.

Material and Methods

The eggs of *Psammechinus miliaris* were fertilized and cultivated at 21–23° C in glass trays as described by LINDAHL (14). Samples were removed at various stages by the method employed by GUSTAFSON and HASSELBERG (8). After washing by centrifugation in 0.44 M KCl, the eggs were suspended in buffer and stirred in a freezing mixture until they had formed a "slush." The eggs were then placed on a mechanical vibrator (AB Vibroverken, Stockholm, 50 cycles/sec) for a period of three minutes. This treatment served to completely disrupt the eggs. Microscopic examination of each homogenate was carried out to determine whether complete cell rupture had occurred.

An aliquot of the samples prepared in this manner was then assayed immediately for a given enzyme activity. In experiments studying the effect of aging the lysate prior to enzyme assay, the samples were stored at 0° C.

Catalase determinations were carried out at 0° C by the method of VON EULER and JOSEPHSON (6). The rapid titration method of BONNICHSEN, CHANCE and THEORELL (2) could not be employed due to the low catalase activity of the sea urchin egg

¹ Rockefeller Foundation Fellow, 1950–1951.

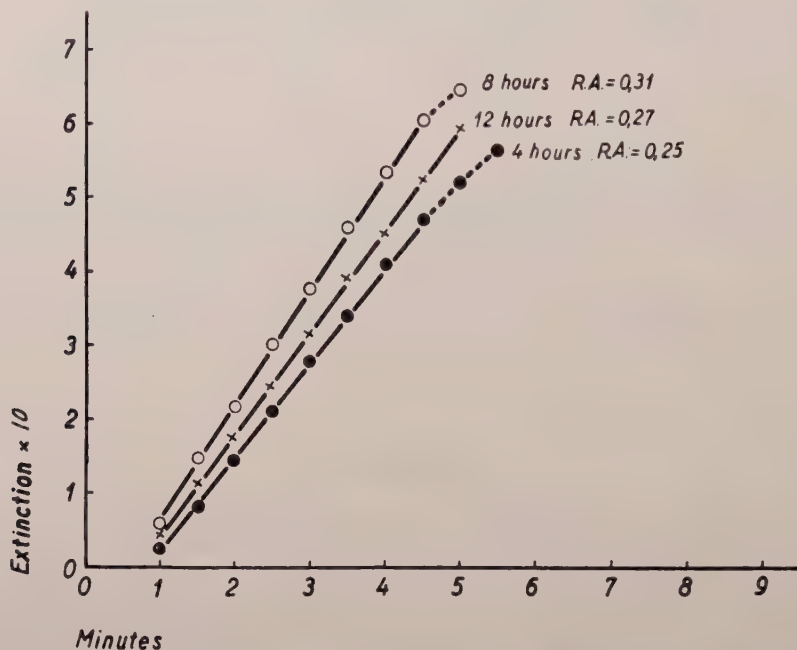


Fig. 1. Cytochrome oxidase activity of sea urchin eggs at three stages of development.

lysates. In a preliminary study the method of FEINSTEIN (7) was employed, using perborate as substrate. In these experiments the analyses were performed on material which had been stored in the frozed state for 2-4 days.

Cytochrome oxidase activity was determined by the colorimetric method of SMITH and STORZ (23) using 2,6-dichlorobenzeneindole-3'-chlorophenol (Eastman) as the acceptor dye. Measurements were made in a Spekker photometer. Two cells of 1 cm depth were set up to contain identical constituents except that the one utilized as a blank contained 0.001 M azide. The system consisted of 3.0 ml of 0.2 M, pH 7.0 sodium phosphate, 1.0 ml of 2×10^{-4} M cytochrome c, and water and enzyme sufficient to give a volume of 5.5 ml. At zero time 2.0 ml of 0.001 M leuco dye was rapidly added to the system with mixing. The rate of oxidation of the dye was then followed, the initial reading being started approximately 1/2 minute after addition of the dye and continued over half-minute intervals until the rate of dye oxidation had started to fall off.

The azide was found to have no effect on the dye reductase or on the rate of dye autoxidation so that the difference in rate of dye oxidation in the azide containing and azide free cuvettes was a measure of the cytochrome oxidase activity. Under the conditions of enzyme activity estimation there were temperature increases in the uninhibited (no azide) system of slightly less than 1°C per minute. The effect of this temperature difference could be partly corrected by control experiments on its effect on dye autoxidation and reductase. The total activity was corrected for these differences. Cytochrome oxidase activity was usually linear with time for a four or five minute interval during the first seven minutes of the experiment. The results for three consecutive activity determinations during the early development of the

sea urchin embryo are shown by the data of Fig. 1. The slope of the activity curve was determined and the effect of 1 ml of enzymes was designated as the relative activity (RA). It is likely that the failure of the activity to fall off rapidly with time as observed by SMITH and STOTZ (23) is partly due to the above noted temperature rise. However, our experiments utilized much higher protein concentrations due to the low enzyme activity of our system. This tends to avoid the loss of activity experienced as a result of dilution of cytochrome oxidase preparations.

The cytochrome oxidase RA of lysates of the sea urchin eggs were determined for periods up to 24 hours after fertilization. It is to be stressed that as in the case of catalase determinations, the cytochrome oxidase activity measurements were designed to show relative changes with time of embryological development. Irrespective of the inherent estimation errors of the method, which have been adequately discussed by SMITH and STOTZ (23), the determinations carried out under identical conditions should give results adequate to show changes in activity levels.

Results

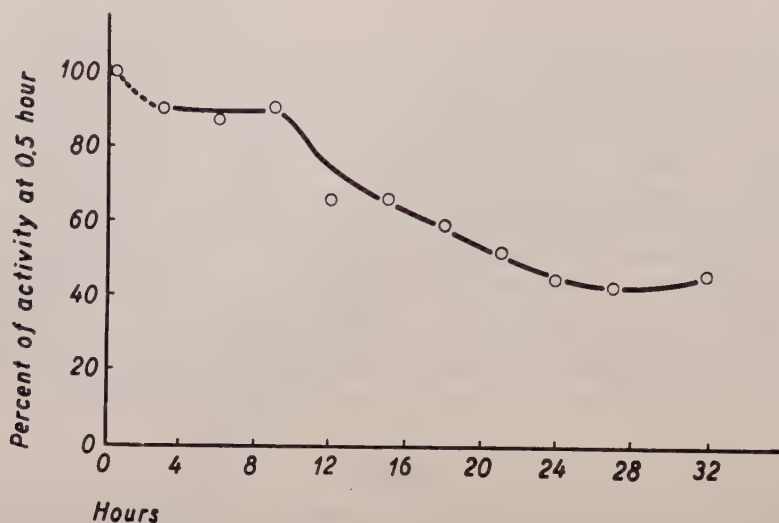
Catalase: All of the activity of this enzyme could be recovered in the soluble supernatant of lysed cells in agreement with the observation of HOLTER (11). Consequently the lysates of these organisms were centrifuged briefly and an aliquot of the supernatant was assayed. The volume of lysate assayed was selected so that a first order reaction constant of 0.025 to 0.040 was obtained. For reasons to be discussed presently, the average of activity values obtained by the 3, 6, 9 and 12 minute titrations were utilized. The results are expressed as the first order reaction constants given by 1 ml of the homogenate. Thus the results are an expression of the relative activity observed at various periods of development rather than an absolute one. The 1 ml aliquot contained the same number of eggs.

The catalase activity of sea urchin embryos showed a decrease of approximately 1 per cent per hour on standing at 0° C. For this reason catalase determinations were carried out immediately after preparation of the lysate. Some preliminary experiments, however, employing the perborate assay method of FEINSTEIN (7) were carried out on material aged for several days in the frozen condition. Good agreement for the assay results on fresh and frozen homogenates were found. The same results were obtained when the method was employed as when the method of VON EULER and JOSEPHSON (6) was utilized.

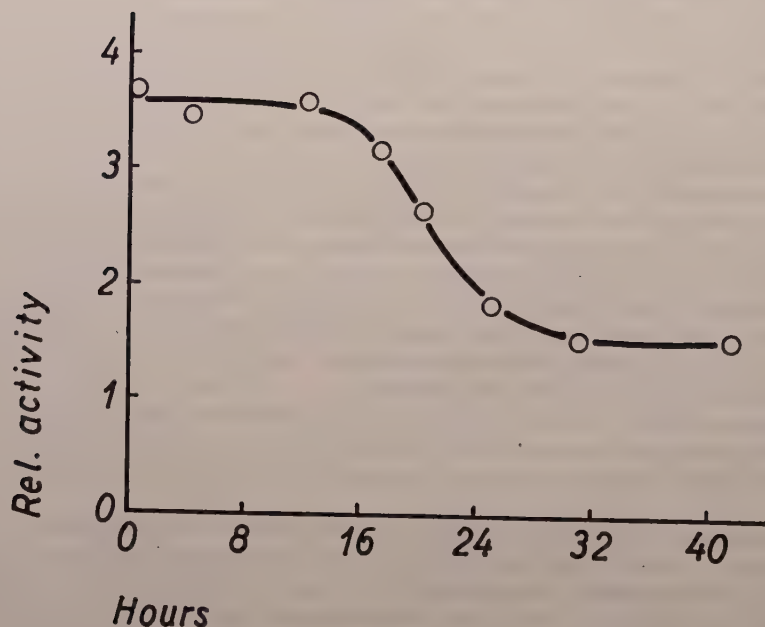
The average results of two experiments are plotted to give Fig. 2 a. Both runs were qualitatively the same. A marked decrease in enzyme activity is seen to occur 8–10 hours after fertilization. After this period the activity remains more or less constant.

A portion of the sea urchin egg preparation used for obtaining the data of Fig. 2 a were treated with Li. Such treatment results in an excessive ento-mesodermal development at the expense of the ectoderm. The activity of eggs treated in this manner when assayed between the 8 and 20 hour period of development gave results similar to those of Fig. 2 a except the activities were approximately 20 % lower.

In the usual determination of catalase by the method of VON EULER and JOSEPHSON (6), the activity falls off with time and the first-order reaction constants obtained at 3, 6, 9 and 12 minutes are extrapolated to zero time. Sea urchin egg lysates usually failed to show this phenomena and indeed often gave the reverse effect, i. e., a marked increase in activity with time. At times the activity at the 12 min. assay period was



a.



b.

Fig. 2 a, b. Relative activity of catalase during development of sea urchin eggs:
 a) Method of Euler and Josephson; fresh material.
 b) Method of Feinstein; material kept in the frozen state for 2—4 days.
 Primary mesenchyme appeared after 9 hours in a. and after 12½ hours in b.

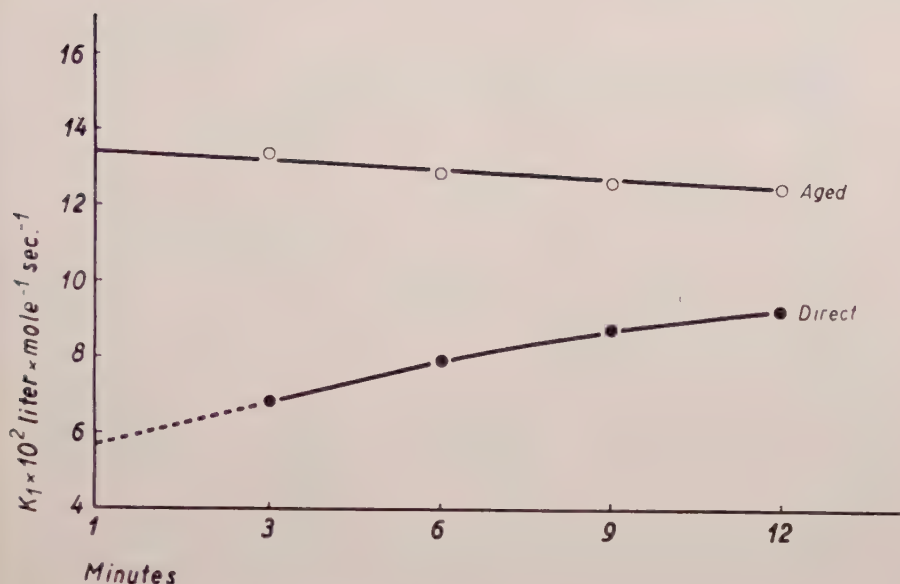


Fig. 3. Effect of aging sea urchin egg lysate 30 minutes prior to addition of substrate.

50–60 per cent higher than at the initial 3-minute period. These results indicated that a catalase inhibitor was being dissociated or destroyed during the assay. This was verified by the following experiment. The enzyme preparation was diluted in the assay buffer and allowed to stand 30 minutes prior to addition of the hydrogen peroxide substrate. The results of this experiment are presented in Fig. 3. The sample assayed in the usual manner shows an enhanced activity at the 12-minute period as compared with the initial value. Aging of the sample results in a marked increase in activity. Initially it was twice that of the aliquot assayed directly. At the 12-minute titration period the difference is approximately 25 %.

The actual increase in activity of the sample aged before assay is greater than indicated, for it is known that considerable amounts of catalase are destroyed on standing in dilute solution, the conditions used in this experiment. The aged sample behaves like a normal catalase in that it shows small activity decrease during the assay period.

The nature of the inhibitor material was investigated briefly. When a "kochsaft" preparation, prepared by heating a sea urchin egg lysate for 2 minutes at 100° C, was added to an enzyme system showing constant activity during the assay period, there was a marked decrease in catalase activity. The activity, however, showed a marked increase during the 12-minute assay period. This is illustrated by Fig. 4. The "kochsaft" was also able to inhibit an enzyme preparation that gave activity increases during assay. This result is shown in Fig. 5. The same tendency to show an increase in activity as a function of assay time is still retained. When this enzyme preparation was aged with "kochsaft" prior to assay, it resulted in an inhibition of approximately 20 % of the activity of the control aged sample (see Fig. 5). The activity, however, showed a decrease with time. Thus it appears that only a portion of the inhibitor show a sensitivity to dilution.

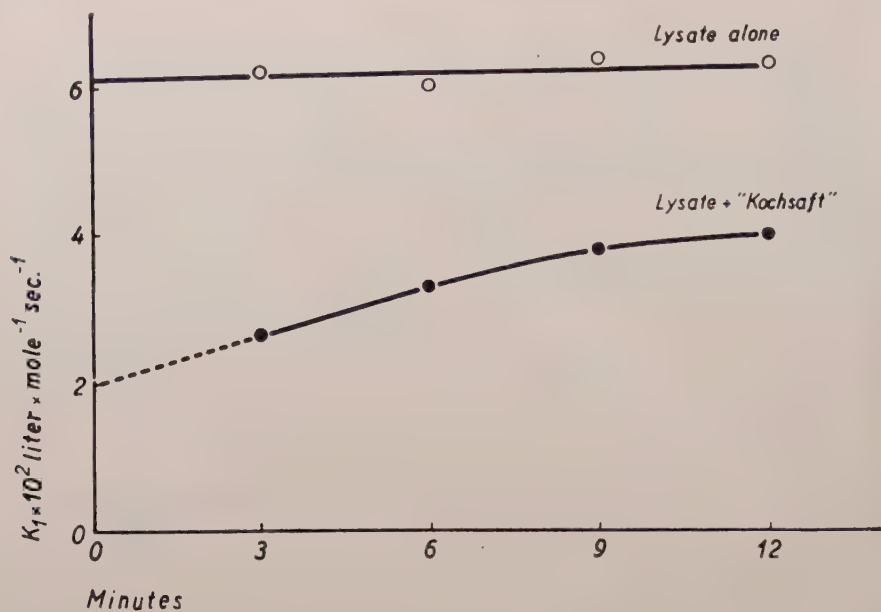


Fig. 4. Effect of lysate „kochsaft“ on catalase activity.

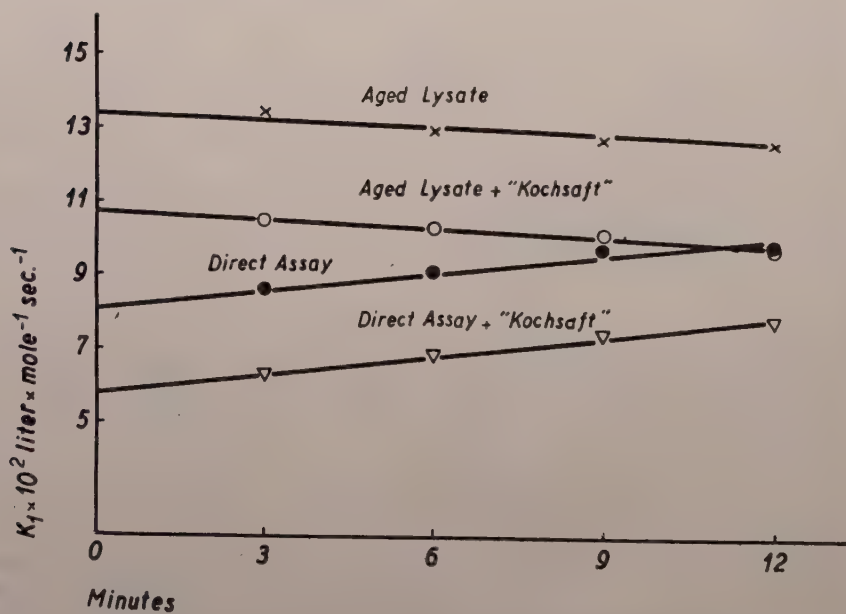


Fig. 5. Effect of lysate „kochsaft“ on catalase activity of aged and unaged samples.

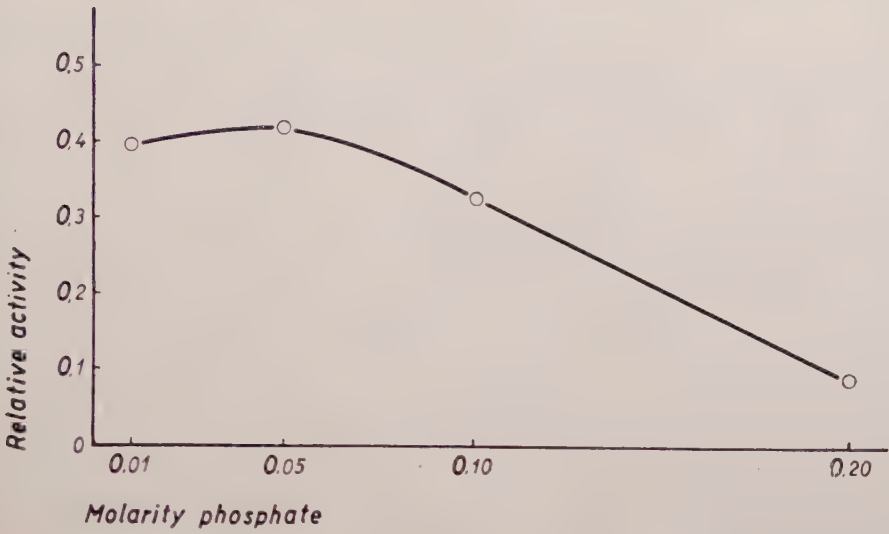


Fig. 6. Effect of phosphate concentration on activity of cytochrome oxidase.

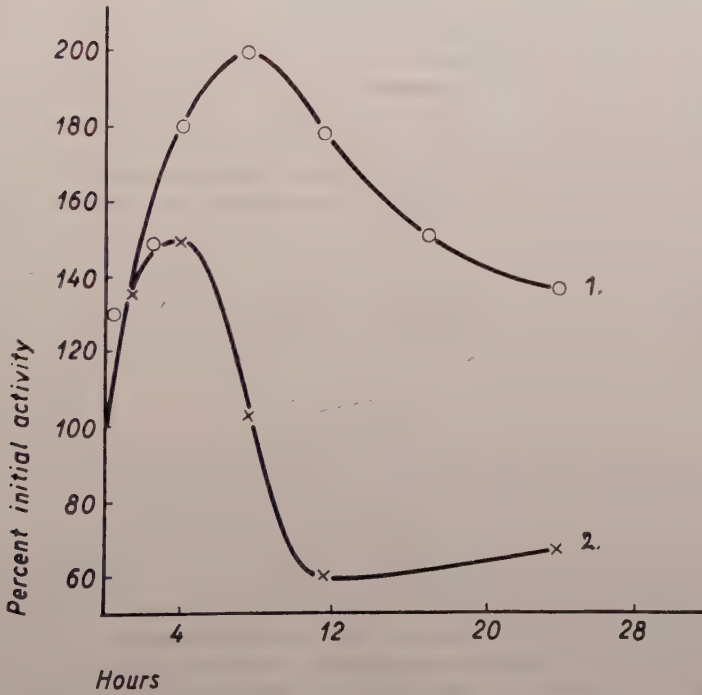


Fig. 7. Changes in cytochrome oxidase activity during development of the sea urchin egg.

"Kochsafts" prepared from half and 15 hour embryo cultures showed strong inhibitory activities. It is not known whether the drop in catalase activity noted at the 8-hour developmental period (see Fig. 2 a) is the result of an increase in this inhibitor. Samples at this time, however, generally showed the activity increases with assay time to a greater extent than earlier samples. No further experiments on the catalase inhibitor activity of "kochsafts" were carried out.

Cytochrome Oxidase: Preliminary experiments revealed that like mammalian tissues, sea urchin embryo lysates could best be assayed for this enzyme by the colorimetric method, at pH near 7. The ionic strength of the medium used to conduct the assays was found to be an important consideration. Sodium phosphate concentrations from 0.01 to 0.20 M were studied. The data of Fig. 6 show that maximum activity obtains near 0.05 M phosphate. At this buffer concentration the enzyme activity of lysates stored at 0° C falls off slowly with time. A marked enzyme inhibition is seen at 0.2 M phosphate. At this concentration, aging of the enzyme results in activity increases. The lysis of the eggs and the enzyme activity measurements were carried out in pH 7.0, 0.05 M sodium phosphate (ionic strength approximately 0.13).

Low speed centrifugation could be used to remove coarse cellular debris without loss in cytochrome oxidase activity. Such a procedure was sometimes resorted to in the older stages of egg development where calcareous structures etc. often give the lysates excessive turbidities.

The cytochrome oxidase was found to increase markedly during the first four hours after fertilization. This usually amounted to 50–100 per cent of the activity of the egg just prior to fertilization. Following the first 6–8 hours of development there was a gradual decrease in cytochrome oxidase activity. The average results for two experiments which gave similar qualitative results are plotted to give curve 1 of Fig. 7. A third experiment following the cytochrome oxidase activity as a function of time is shown in curve 2 of this figure. A smaller initial activity rise and a much greater relative decrease in activity is noted for the latter experiment. The decrease in activity for this sample likewise started much earlier.

While the results for different experiments showed greater deviations in cytochrome oxidase activity than were noted for catalase, it was clearly evident that the former activity shows marked increases after fertilization. This is followed by a fall after 6–8 hours of development. "Kochsafts" had no appreciable effect on the cytochrome oxidase activity.

No appreciable peroxidase or phenol oxidase activities were evidenced by sea urchin egg lysates when tested by the colorimetric procedures of SMITH et al. (21, 22).

Discussion

Previous studies of the oxygen uptake (15, 3), cholinesterase (1), alkaline phosphatase (8), succinic and malic acid dehydrogenases, glutaminase, apyrase and cathepsin II (9) activities of the developing sea urchin egg have shown marked increases during development. The enzymes (8, 9) show activity rises beginning in the mesenchymeblastula stage and are presumably localized for the most part in the mitochondria (9). The period of visible differentiation thus should be characterized by an elaboration of mitochondria as was recently demonstrated by direct mitochondrial counts (10). Cytochrome oxidase which is largely localized in mitochondria (5) could thus be expected to show a rise in activity parallel to the number of mitochondria. LINDAHL (15) has also postulated the synthesis of a CO sensitive O₂ trans-

ferring enzyme on the basis of studies on the effect of the former gas on sea urchin embryo respiration. The result obtained in our work, on the contrary, demonstrates a drop in the activity. This result closely agrees with the histochemical studies of RIES (18) cf. (17) on the indophenoloxidase activity of intact eggs and larvae. This agreement even applies to earlier stages of development where there is a strong rise in activity of the living material.

The activity drop may reflect a real decrease in indophenoloxidase activity of the living material. It may, however, more likely be an apparent change resulting from assay technique. A true rise in the activity may be obscured by a change in stability or accessibility of the enzyme, or by activity interference from other enzymes or substrates, etc. The drop may in some way be related to the development of mitochondria from mitochondrial precursors, cf. (9, 10). The activity rise after fertilization may likewise be only apparent as will be discussed below.

As embryonic development proceeds a sheath may develop around the mitochondria, cf. (16). This may check the penetration of cytochrome c into the mitochondrion from the medium. Preliminary observations favour this hypothesis, demonstrating a low but increasing activity of the sample on aging in 0.2 M phosphate buffer. During this aging a swelling and possibly a breaking of the mitochondrial capsule may take place with the development of conditions more favorable for enzyme-substrate union. A systematic study on the cytochrome oxidase activity as a function of aging in phosphate or other buffers of varying concentrations is suggested.

Cytochrome oxidase and succinoxidase, both associated with mitochondria, show activity losses on aging, repeated freezing at low temperatures, drying, and other kinds of treatment (12, 13, 4). These treatments have been suggested to change the colloidal structure of the active molecules, impairing the mutual accessibility of the components of the system. The drop in cytochrome oxidase activity during development may thus reflect an increasing lability of the system as the enzyme gradually becomes incorporated into the mitochondria (9, 10). The possible transition from a relatively stable soluble enzyme to a more labile morphological unit in terms of the enzyme assay conditions employed would provide for the observed results.

The lower activity of the unfertilized egg may also reflect a higher degree of manipulative enzymatic destruction. The rigidity of the cytoplasm at this stage is much lower than after fertilization (19) and along with the lack of a fertilization membrane it may lead to a greater destruction during homogenization. A series of determinations of the activity in samples subjected to varying degrees of severity in terms of homogenizations might throw light on this question. However, a more logical interpretation is suggested from the increased respiratory activity immediately following fertilization. This may result from a change in dehydrogenase activity, or the likely enhanced carrier activity between these enzymes and the cyanide sensitive oxidase systems, cf. (15). Structural changes may play an important role for the sudden activation of the Warburg-Keilin system as suggested by RUNNSTRÖM (20). One may thus suggest that the increased initial activity in our experiments as well as those of RIES (18) is synchronous with increased carrier activity or changes in structural relations. The initial rise in oxidase activity may thus be real and not depend upon a different degree of destruction before and after fertilization.

It should be kept in mind that any explanation for the changes in activity of a given enzyme must be applicable to results for both histochemical and homogenate studies. SPIEGELMAN and STEINBACH (24) studied the respiratory rates of whole embryos and cell-free breis of *Rana* at various stages of development. The data

they presented are very similar to those obtained by the present authors in a different material, apart from the rise during the first few hours after fertilization. SPIEGELMAN and STEINBACH conclude that their data find their most plausible interpretation in terms of structure orientation and the consequences of its destruction. This interpretation agrees with that of the present authors for results on a sea urchin material.

The results for catalase are likewise in contrast to the findings for the other enzymes studied. The marked decrease in the activity of this enzyme seen at the 8–10 hour period of development would suggest a decrease in the amount of the enzyme. Although the role of catalase in the living organism remains obscure, it would again be surprising if an enzyme present in appreciable concentration at fertilization would show a marked decrease during a rather intense developmental period. The marked decrease in activity noted upon aging of a dilute enzyme suspension and the inhibitory effects of an embryo lysate "kochsaft" suggest that the result is merely an activity decrease due to the formation of an inhibitor. The actual concentration of the enzyme may remain constant or increase. It would appear desirable to determine whether the decrease in activity noted is synonymous with an increase in the inhibitor. However, before this problem can be subjected to careful study, it will be necessary to investigate the properties of the inhibitor more closely so that this variable can be controlled.

The results which have been experienced for catalase and cytochrome oxidase suggest that enzyme assay experiments on lysates of sea urchin embryos should be cautiously interpreted. It should not be construed that the activity changes measured in a lysate are synchronous with the actual changes in the concentration of a given enzyme.

SUMMARY

1. The catalase activity of developing sea urchin eggs falls markedly after approximately eight hours development.
2. A catalase inhibitor in the lysate of sea urchin eggs could be demonstrated by the use of a "kochsaft" of this material.
3. The cytochrome oxidase activity of lysates of this organism after a high initial rise falls markedly near the 6–8 hour of development.

The authors wish to express their most cordial thanks to Professor JOHN RUNNSTRÖM for the great interest he has shown in our work. We also owe a great debt of gratitude to the Prefect of Kristineberg's Zoological Station, Professor NILS HOLMGREN, and to the Director of the Station, Doctor GUNNAR GUSTAFSSON, for their never failing generosity.

From Wenner-Gren's Institute of Experimental Biology, Stockholm, and Kristineberg's Zoological Station, Fiskebäckskil.

REFERENCES.

1. AUGUSTINSSON, K.-B., and GUSTAFSON, T., *J. Cellular Comp. Physiol.*, *34*, 311 (1949).
2. BONNICHSEN, R. K., CHANCE, B., and THEORELL, H., *Acta Chem. Scand.*, *1*, 685 (1947).
3. BOREI, H., *Biol. Bull.*, *95*, 124 (1948).
4. ——— *Biochem. J.*, *47*, 227 (1950).
5. DOUNCE, A. L., *The Enzymes*, ed. by Sumner, J. O., and Myrbäck, K., Vol. 1, part 1, p. 187.
6. VON EULER, H., and JOSEPHSON, K., *Ann.*, *452*, 158 (1927).
7. FEINSTEIN, R. W., *J. Biol. Chem.*, *180*, 1197 (1949).
8. GUSTAFSON, T., and HASSELBERG, I., *Exptl. Cell Res.*, *1*, 371 (1950).
9. ——— *I.*, *ibid.*, *2*, 642 (1951).
10. GUSTAFSON, T., and LENICQUE, P., *ibid.*, *3*, 251 (1952).
11. HOLTER, H., and DOYLE, Wm. L., *Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg, Sér. Chim.*, *22*, 219 (1938).
12. KEILIN, D., and HARTREE, E. F., *Biochem. J.*, *31*, 503 (1947).
13. ——— *ibid.*, *44*, 205 (1949).
14. LINDAHL, P.-E., *Acta Zool.*, Stockholm, *17*, 179 (1936).
15. ——— *Z. Vergleich. Physiol.*, *27*, 136, 233 (1939).
16. MÜHLETHALER, K., MÜLLER, A. F., and ZOLLINGER, H. U., *Experientia*, *6*, 16 (1950).
17. RANZI, S., and FALKENHEIM, M., *Pubbl. Staz. Zool.*, Napoli, *16*, 436 (1937).
18. RIES, E., *ibid.*, *16*, 363 (1937).
19. RUNNSTRÖM, J., *Advances in Enzymology*, *9*, 241 (1949).
20. ——— *Protoplasma*, *10*, 106 (1930).
21. SMITH, F. G., ROBINSON, W. B., and STOTZ, E., *J. Biol. Chem.* *179*, 881 (1949).
22. SMITH, F. G., and STOTZ, E., *ibid.*, *179*, 865 (1949).
23. ——— *ibid.*, *179*, 891 (1949).
24. SPIEGELMAN, S., and STEINBACH, H. B., *Biol. Bull.*, *88*, 254 (1945).

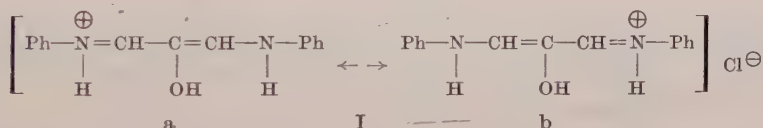
Tryckt den 28 mars 1952

Uppsala 1952. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

Über die Umsetzungsprodukte des Triose-Reduktons mit Anilin

Von BERND EISTERT und HANS HASSELQUIST

Durch Erhitzen von Triose-Redukton mit Anilin in stark salzsaurer Lösung erhielten v. EULER, HASSELQUIST und LÖÖV (1) ein Hydrochlorid vom Schmp. 260°, das sich als das Salz eines Redukton-Anilids erwies. COCKER, O'MEARA, SCHWARZ und STUART (2) zeigten später, dass dieses Salz die Zusammensetzung des *Mono*-Hydrochlorids des *3-Anilino-1-anilo-propen-(2)-ols-(2)* hat, das man vom Standpunkte der Mesomerie-Lehre aus als ein „oxy-vinylenhomologes Amidiniumsalz“ $I \text{ a} \leftrightarrow \text{b}$ formulieren kann (3):



Die entsprechende freie Base, die man als „Redukton-*Dianil*“ II ($X = \text{OH}$) bezeichnen kann, konnte von COCKER und Mitarbeitern (2) nicht in reiner Form gewonnen werden; v. EULER und Mitarbeiter (1) erhielten bei der Umsetzung des Salzes vom Schmp. 260° mit Natriumacetat in wässriger Lösung ein gelbbraunes Produkt, das bei 64° zu schmelzen begann und erst bei ca. 100° durchsichtig wurde; es wurde auf Grund der Titration mit TILLMANS' Reagens als Hydrat des Redukton-*Mono*-Anils $\text{C}_9\text{H}_9\text{O}_2\text{N} + 4 \text{H}_2\text{O}$ angesehen (4), zumal da bei der Umsetzung von Redukton mit *p*-Nitro-Anilin (jedoch in neutralem Medium, s. Nachtrag!) das entsprechende, allerdings wasserfreie, *Mono*-Nitro-Anil $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4\text{N}_2$ erhalten wurde (1).

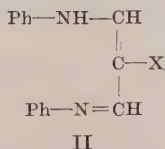
Es gelang uns nun, die dem Salz I entsprechende freie Base in reiner Form herzustellen. Sie erwies sich als das *Redukton-Dianil* II ($X = \text{OH}$):

2,5 g reines, aus Methanol umkristallisiertes Hydrochlorid I werden bei ca. 50° in 1000 ccm Wasser gelöst. Man lässt unter kräftigem Rühren 150 ccm gesättigte Natriumacetatlösung zufließen, saugt den roten, kristallinen Niederschlag ab, wäscht ihn mit Wasser und trocknet ihn bei gew. Temp. im Vakuum-Exsikkator. Ausb. 1 g.

Das Produkt wird bei gew. Temp. in 20 ccm Aceton gelöst. Man fügt zur Lösung Wasser hinzu, solange keine Trübung eintritt (insgesamt höchstens 9 ccm), und stellt dann in den Eisschrank. Dabei kristallisieren 0,2 g schöne, rubinrote Kristalle mit blau-violetttem Oberflächenglanz aus. Schmp. 120–122°.

$C_{15}H_{14}ON_2$ (238,28)	ber. C 75,60	H 5,92	O 6,71	N 11,76
	gef. 75,44	6,31	7,0	11,50 ¹

Die Dianil-Base löst sich leicht in organischen Lösungsmitteln und (mit gelber Farbe) in verd. Säuren; mit verd. Salzsäure erhält man das Hydrochlorid I vom Schmp. 260° zurück. Sie ähnelt dem unsubstituierten *Malonaldehyd-Dianil* II ($X = H$)² nicht nur durch ihren Oberflächenglanz, sondern auch dadurch, dass sie, wie dieses, in unreinem Zustande nach Carbylamin riecht.



Bei der Umsetzung der unreinen, gelbbraun gefärbten Base vom Schmp. 64–100°, die wir s. Z. für das Redukton-Mono-Anil II gehalten hatten, mit *Diazomethan* erhielten wir (3) s. Z. neben viel Öl geringe Mengen von Kristallen vom Schmp. 118–119° (Zers.). Die Vermutung, dass es sich dabei um den Monomethyläther des Redukton-Monoanils handelte, muss aufgegeben werden (s. unten). Versuche, die reine Dianil-Base mit Diazomethan umzusetzen, stehen noch aus.

Das wirkliche „*Redukton-Monoanil*“ $C_9H_9O_2N$ erhält man, wenn man Redukton mit Anilin, zweckmässig in *schwach* saurem Medium, in der *Kälte* umgesetzt (2). Wir verfahren folgendermassen:

In eine Lösung von 2 ccm konz. Salzsäure und 2 ccm Anilin in 25 ccm Wasser rührt man bei gew. Temp. 2 g Triose-Redukton ein. Sobald letzteres gelöst ist, stellt man die Lösung in den Eisschrank. Der ausgefallene Niederschlag wird nach 1–2 Std. abgesaugt, mit wenig Wasser gewaschen und im Vakuum-Exsikkator über $CaCl_2$ bei gew. Temp. getrocknet. Das *gelbe* Produkt färbt sich am *Licht* oberflächlich *orangerot*. — Man löst es unter Erwärmen in Benzol, filtriert von geringen Mengen unlöslichen, intensiv gelben Hydrochlorids I ab und versetzt das Filtrat bis zur Trübung mit Petroläther. Beim Stehenlassen im Eisschrank kristallisiert das reine Mono-Anil in Form feiner, verfilzter Nadelchen aus. Schmp. 119–120°. Aus dem Filtrat gewinnt man durch weiteren Zusatz von Petroläther weitere Mengen fast ebenso reinen Produkts. Ausbeute insgesamt ca. 2 g. Dieses Produkt ändert seine *schwach* gelbliche Farbe am Licht *nicht*.

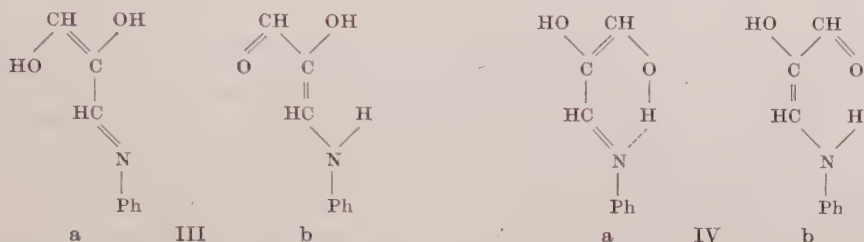
Beim Kochen mit Wasser schmilzt das Mono-Anil und geht dann mit *gelber* Farbe in Lösung. Beim Stehenlassen der wässrigen Lösung in der Kälte kristallisiert wieder das fast farblose Mono-Anil von Schmp. 119° in verfilzten Nadelchen aus.

In wässriger Natriumacetatlösung ist das Anil in der Wärme mit gelber Farbe löslich; in der Kälte bleibt die Lösung klar.

¹ Die Analysen wurden im Untersuchungs-Laboratorium der Bad. Anilin- und Sodafabrik, Ludwigshafen/Rh., unter Leitung von Hrn. Dr. B. WURZSCHMITT ausgeführt, wofür wir auch an dieser Stelle verbindlichst danken.

² R. HÜTTEL, B. 74, 1828/29 [1941]. Wir danken Hrn. Dr. L. LORENZ für ein Vergleichspräparat.

Für das „Redukton-Mono-Anil“ kommen mehrere Konstitutionsformeln in Betracht:



Als „oxy-vinylhomologes Carbonsäure-Anilid“ kann es zwei *tautomere* Formeln haben, und wegen der vorhandenen C=C-Doppelbindung kann jede tautomere Form in cis-trans-Isomeren auftreten. Die Formeln III a und IV a symbolisieren die cis-trans-Isomeren Formen der eigentlichen „Anil“-Form, also des 1-Anilo-2-propendiols-(2,3), während Formeln III b und IV b die tautomeren „Aldehyd“-Formen wiedergeben (3-Anilino-2-oxy-2-propen-al-(1)). Infolge der Chelatisierungsmöglichkeit werden die Formen IV a und IV b identisch sein; wir nehmen an, dass das aus der Benzol-Lösung mit Petroläther ausgefällte Präparat vom Schmp. 119–120° diese Konstitution hat, wobei zunächst zu entscheiden wäre, welcher der beiden „Grenzformeln“ IV a bzw. IV b das grössere „Gewicht“ zukäme. COCKER und Mitarbeiter (2) bevorzugen die „Aldehyd“-Formel IV b, weil sie auch mit Monomethyl-Anilin eine entsprechende „Methyl-anilino“-Verbindung herstellen konnten; da bei dieser aber keine Chelatisierung möglich ist, ist sie gemäss III b (NCH₃ statt NH) zu formulieren; ihre Herstellbarkeit beweist also nichts über die Bindungsverhältnisse im Methyl-freien Redukton-Anil IV a $\leftarrow \rightarrow$ b.

Es ist möglich, dass die bei der Herstellung des Mono-Anils zunächst anfallenden gelben, lichtempfindlichen Produkte eine nicht-chelatisierte, stereomere Form III a oder III b enthalten. Vor allem dürften in den gelben wässrigen Lösungen des Mono-Anils Hydrate solcher offenen Formen vorliegen.

Bei der Behandlung des Redukton-Monoanils mit Essigsäureanhydrid entsteht eine *Mono-acetylverbindung*:

1 g Mono-Anil wird mit 2 ccm Essigsäureanhydrid ca. 5 Minuten im siedenden Wasserbad erwärmt. Nach dem Erkalten verdünnt man mit ca. 5 ccm Benzol, wobei die Acetylverbindung in glitzernden Blättchen vom Schmp. 163–164° ausfällt. Man kann das Acetylierungsgemisch auch in üblicher Weise mit Wasser bis zur Zersetzung des überschüssigen Essigsäureanhydrids erwärmen; das dabei zunächst erhaltene Öl erstarrt beim Anreiben in der Kälte und kann aus ver. Methanol umkristallisiert werden. Schmp. 164°.

C ₁₁ H ₁₁ O ₃ N (205,2)	ber. C 64,37	H 5,40	O 23,39	N 6,83
	gef. 64,28	6,04	23,2	6,54

Wir nehmen an, dass die Acetylierung an der OH-Gruppe am Kohlenstoffatom C₂ erfolgt ist, die sowohl in der Formel IV a wie in IV b vorhanden ist und auf jeden Fall nur schwach-sauren Charakter hat. W. COCKER u. MITARB. (2) schreiben einem von ihnen hergestellten Monobenzoyl-Derivat die Formel Ph—N=CH—C(OH)=CH—OBz zu; sie erhielten es aus dem isolierten

Natrium-Derivat des Mono-Anils mit Benzoylchlorid. Wir halten gleichwohl für unser, aus dem *freien* Mono-Anil hergestelltes Acetyl-Derivat die Acylierung in Stellung 2 für wahrscheinlicher.

Bei der Umsetzung des Redukton-Mono-Anils mit *Dimethylsulfat* in *wässrig-alkalischem* Medium wird eine Methylgruppe aufgenommen. Im Hinblick auf die Erfahrungen an anderen Endiol-Derivaten¹ tritt die Methylgruppe unter diesen Umständen ebenfalls an die Stelle der am schwächsten sauren OH-Gruppe, also an das Kohlenstoffatom C₂. Zur Herstellung des *Redukton-mono-anil-2-methyläthers* verfahren wir wie folgt:

1 g reines Redukton-Monoanil wurde in möglichst wenig Methanol gelöst. Man fügte 3 cem Dimethylsulfat hinzu und trug das Gemisch unter gutem Rühren in überschüssige 1-n Natronlauge ein. Nach ca. 1-stündigem Rühren bei gew. Temp. wurden die ausgefallenen Kristallblättchen abgesaugt, mit Wasser gewaschen, getrocknet und aus verd. Methanol oder aus Tetrachlorkohlenstoff umkristallisiert. Schmp. 123–124°. Ausb. ca. 0,7 g.

C ₁₀ H ₁₁ O ₂ N (177,19)	ber. C 67,76	H 6,26	O 18,48	N 7,90
	gef. 67,71	6,34	18,3	7,33

Diese Versuche konnten naturgemäss keine Aussagen über die Konstitution des Mono-Anils in Sinne der Formeln IV a oder IV b erbringen. Wir versuchten nun, durch Umsetzung mit *Diazomethan* unter verschiedenen Bedingungen Licht in diese Frage zu bringen.

Umsetzungen des Redukton-Monoanils mit Diazomethan:

a) Das Mono-Anil wurde mit überschüssiger ätherischer Diazomethan-Lösung übergossen, wobei es unter schwacher N₂-Entwicklung allmählich in Lösung ging. Die Lösung wurde bei vermindertem Druck bei 30–40° eingedampft. Dabei wurde sie zäh und braun, und es gelang nicht, kristalline Reaktionsprodukte daraus zu gewinnen.

b) Bei einem zweiten Versuch wurde die Methylierungs-Lösung im Vakuum bei höchstens 10° eingedampft. Es hinterblieb ein honiggelbes, zähes Öl, aus dem sich gelbe, derbe Kristalle abschieden. Beim Versuch, sie umzukristallisieren, verharzten sie unter Dunkelfärbung.

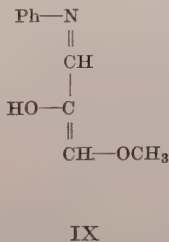
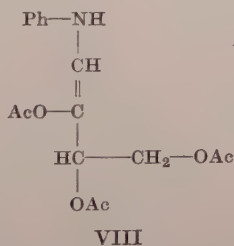
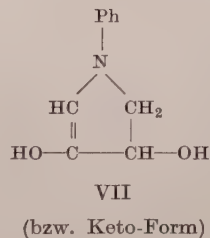
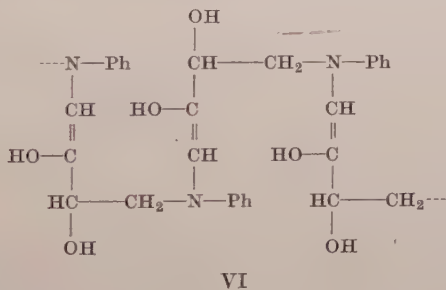
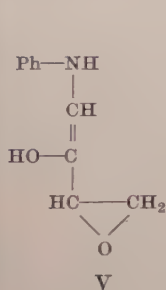
c) Bei weiteren Versuchen wurde das nach b) gewonnene, mit Kristallen durchsetzte Öl in viel Benzol in der Kälte gelöst; die Lösung wurde mehrere Tage im Dunkeln bei gew. Temp. stehen gelassen und dann bei etwa 10° im Vakuum eingeengt. Dabei schied sich ein zähes Öl ab. Dieses wurde mit Tetrachlorkohlenstoff erwärmt, wobei nur wenig in Lösung ging. Die Tetrachlorkohlenstofflösung wurde wieder eingeengt, erneut ausgeschiedenes Öl abgetrennt und die verbleibende CCl₄-Lösung tropfenweise mit Petroläther versetzt. Dabei fielen Kriställchen aus. Diese wurden in kaltem Benzol gelöst. Die Lösung wurde mit Tierkohle geschüttelt und das Filtrat erneut tropfenweise mit Petroläther versetzt. Dabei fielen zunächst braune Flocken aus. Von diesen wurde abfiltriert; das farblose Filtrat lieferte bei weiterem Zutropfen von Petroläther lange, weiche, farblose Nadelchen vom Schmp. 84–89° (Zers.) in sehr geringer Menge. Die Analysen stimmen auf ein Produkt, das um eine CH₂-Gruppe reicher ist als das Mono-Anil:

C ₁₀ H ₁₁ O ₂ N (177,19)	ber. C 67,76	H 6,26	O 18,48	N 7,90
	gef. 67,76	6,16	18,2	7,91

¹ Vergl. F. ARNDT u. B. EISTERT, B. 62, 42 [1929].

d) Bei einem Versuch wurde das nach b) gewonnene, kristallhaltige Öl mit etwa der doppelten Menge *Essigsäureanhydrid* und einigen Kriställchen von wasserfreiem Eisen(III)-chlorid versetzt. Nach 1-stündigem Stehen wurde Wasser hinzugefügt und bis zur Zersetzung des überschüssigen Essigsäureanhydrids auf dem Wasserbad erwärmt. Das ausgefallene Öl erstarrte beim Abkühlen und Ankratzen. Beim Umkristallisieren aus viel Benzol schied sich die Mono-Acetylverbindung des *Redukton-Monoanils* in kleinen Mengen aus; Schmp. und Misch-Schmp. 163–164° (s. oben).

Die Versuche mit Diazomethan lassen folgende Deutung möglich erscheinen: Das „*Redukton-Monoanil*“ liegt in einer Form vor, in der es mit Diazomethan im wesentlichen als „*Anilino-Aldehyd*“ IV b reagiert und ein *Aethylenoxyd*-Derivat V liefert.¹ Dieses kann mit den NH-Gruppen von Nachbar-Molekeln reagieren, wobei hochmolekulare Produkte vom Typus VI entstehen; es kann aber auch innermolekulare Reaktion zwischen Aethylenoxyd-Ring und NH-Gruppe erfolgen, wobei ein *Pyrrolin*-Derivat VII gebildet würde. Wir vermuten, dass die gemäss b) vorübergehend erhaltenen Kristalle das *Aethylenoxyd*-Derivat V sein könnten, das sich beim Erwärmen zu Produkten vom Typus VI polymerisiert.² Es gelang beim Versuch d) nicht, das Aethylenoxyd-Derivat als *Diacetyl*verbindung des entsprechenden Glykols (bzw. als *Triacetyl*verbindung VIII) abzufangen; vielmehr wurde dabei nur die Mono-Acetylverbindung des *Redukton-Monoanils* isoliert, allerdings nur in kleinen Mengen. Dessen Bildung erklärt sich vielleicht daraus, dass die Umsetzung mit Diazomethan noch nicht beendet war, sodass unumgesetztes Anil vorhanden war. — Ob das unter b) beschriebene Produkt der *3-Methyläther* IX oder das isomere *Pyrrolin*-Derivat VII ist, wurde noch nicht aufgeklärt.



¹ Über die Bildung von *Aethylenoxyd*-Derivaten aus Aldehyden und Diazomethan s. F. ARNDT u. B. EISTERT, B. 61, 1121 [1928].

² Vergl. die bekannten zwischenmolekularen Reaktionen zwischen Aethylenoxyden und primären oder sekundären Aminen, bei denen Amino-alkohole entstehen, z. B. die technisch ausgeübte Herstellung von β -Oxyäthylanilin aus Anilin und Aethylenoxyd; Demole, Lieb. Ann. 173, 127.

Falls den Kristallen vom Schmp. 84–89° (Zers.) die Formel IX zukäme, so wäre damit erwiesen, dass im Reduktion-Mono-Anil auch die Formel IV a eine gewisse Rolle spielt; die Bildung von Produkten, die leicht zu hochmolekularen Ölen und Harzen polymerisieren, lässt sich aber am besten mit der Formel IV b erklären, wonach mit Diazomethan vorwiegend *Aethylenoxyd*-Derivat V als Primär-Produkt entsteht. Weitere Versuche, die bereits im Gange sind, sollen darüber Klarheit bringen.

Der Eine von uns (B. E.) dankt Herrn Prof. H. VON EULER herzlichst für die Einladung in sein Institut, die die Ausführung der Versuche ermöglichte, und für viele Anregungen.

Stockholm, Institut für Organisch-Chemische Forschung und Vitamin-Institut (Oktober 1951).

Nachtrag bei der Korrektur (18.II. 1952)

Nach Abschluss vorstehender Arbeit wurde uns durch ein kurzes Vortragsreferat¹ bekannt, dass Herr Prof. Dr. WALTER KÖNIG (Institut f. Farbstoff- und Textilchemie der Technischen Hochschule, Dresden) bereits in den Jahren 1939–1944 im Rahmen seiner systematischen Arbeiten über *Polymethinfarbstoffe* auch Umsetzungen zwischen Triose-Reduktion und verschiedenen aromatischen Aminen ausgeführt hat. Die Versuche wurden in der Dissertation von Frl. IRENE KAUFMANN, Dresden 1945, niedergelegt. Durch freundliche Vermittlung von Herrn Kollegen W. KÖNIG und Frl. Dr. KAUFMANN, denen wir auch an dieser Stelle verbindlichst danken, wurde uns eine Abschrift der Dissertation zugänglich, deren maschinenschriftliches Original bei der Zerstörung von Dresden im Frühjahr 1945 verloren ging. Wir entnehmen ihr u. a., dass W. KÖNIG und I. KAUFMANN bei der Umsetzung von Reduktion mit Anilinhydrochlorid in siedender wässriger Lösung bereits ein goldgelbkristallisierendes Hydrochlorid vom Zers. P. 249° erhielten, für das sie aus der N-Bestimmung die gleiche Formel $C_{15}H_{15}ON_2Cl$ ableiteten wie viel später COCKER und MITARB. (2). Sie stellten daraus auch das Perchlorat, gelbe Nadeln vom Fp. 224°, her. Weitere Umsetzungen wurden damit nicht ausgeführt.

Analoge „oxyvinylhomologe Amidiniumsalze“, die ausdrücklich als solche aufgefasst und als mesomere onium-halochrome Farbstoffe systematisiert wurden, erhielten W. KÖNIG und I. KAUFMANN auch bei der Umsetzung vieler Kern-Substitutionsprodukte des Anilins mit Reduktion in *siedender, saurer* Lösung. So wurde aus 0,1 g Reduktion und 0,32 g p-Nitroanilin in 20 ccm 75%igem Methanol mit 3 Tropfen konzentrierter Salzsäure nach 15 Minuten Kochen das Salz $C_{15}H_{13}O_5N_4Cl$, orangefarbene Nadelchen vom Fp. 255°, erhalten, dessen alkoholische Lösung mit Alkali Farbumschlag zu einer violettroten Lösung des „acihalochromen“ Nitronsäure-Anions erleidet. Aus o-Nitroanilin entsteht dagegen unter den gleichen Bedingungen nur ein (rotes) Mono-o-Nitroanil vom Fp. 218°, das dem von EULER und MITARB. (1) aus p-Nitroanilin in *neutralem* Medium erhaltenen, gleichfalls roten Mono-p-Nitroanil vom Fp. 235–237° analog ist.

Bei der Umsetzung von Reduktion mit p-Aminobenzoesäureestern in methanolisch-salzsaurer Lösung (z. B. 0,3 g Reduktion, 1,1 g Äthylester, 50 ccm Methanol

¹ Chemikerzeitung 75, 368 [1951].

und 10 Tropfen konz. HCl) wurden ebenfalls gelbe Hydrochloride vom Typus $[\text{ROOC}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NH}-\text{CH}=\text{C}(\text{OH})-\text{CH}=\text{NH}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{COOR}]\text{Cl}$ erhalten: R = C_2H_5 (Zers. P. 246°); n- C_3H_7 (251°); iso- C_4H_9 (259°).

Es scheint danach, dass man beim Arbeiten in *saurem* Medium in der *Wärme* i. allgem. mesomere „Amidinium-Farbsalze“ vom Typus I $a \leftrightarrow b$ erhält, falls das benützte Amin nicht zu schwach basisch bzw. sterisch behindert ist (o-Nitroanilin!), während beim Arbeiten in *neutralem* Medium, besonders in der Kälte, Mono-Anile vom Typus III bzw. IV entstehen. Damit erklären sich vermutlich verschiedene Widersprüche in den Angaben der einzelnen Arbeitskreise.

B. EISTERT.

LITERATUR: (1) H. von Euler, H. Hasselquist u. U. Lööv, Arkiv f. Kemi, Mineral. och Geol. 26 A, No. 17 [1948] S. 3/4. — (2) W. Cocker, R. A. Q. O'Meara, J. C. P. Schwarz u. E. R. Stuart, J. chem. Soc. London 1950, 2052. — (3) B. Eistert, dieses Arkiv Bd. 2, Nr. 6 [1950] S. 130. — (4) H. von Euler u. H. Hasselquist, Reduktone (Samml. chemischer u. chem.-technologischer Vorträge, Neue Folge, Bd. 50, Verlag Ferdinand Enke, Stuttgart, 1950), S. 20.

Tryckt den 28 mars 1952

Uppsala 1952. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB



Physico-chemical investigations on animal cellulose (Tunicin)

By BENGT G. RÅNBY

With 4 plates and 3 figures in the text

I. Introduction

Over a hundred years ago it was shown that the mantles of the sea animals *Ascidiae* (tunicates, or mantle animals) contain a nitrogen-free carbohydrate with properties and composition very similar to plant cellulose (1). Because of its greater resistance to chemical action and its peculiar tissue properties, this carbohydrate was called *tunicin* (2) to avoid confusion with the corresponding plant carbohydrate, the *cellulose*. A reducing sugar was formed from tunicin by hydrolysis with mineral acid (2, 3), which was apparently identical with that obtained from plant cellulose and was later shown to be glucose (4), possibly contaminated with small amounts of another mono-saccharide (neither galactose, mannose, nor a pentose). This possible contamination has not been studied further.

Plant and animal cellulose have been compared in a series of investigations. They both become coloured with iodine either after treatment with sulphuric acid (3) or in concentrated aqueous zinc chloride (4). They are soluble in copper-ammonia (Schweitzer's solution), in an acid zinc chloride solution and in conc. sulphuric acid (1, 3, 4). Animal cellulose can be nitrated with fuming nitric acid or a mixture of nitric and sulphuric acids (3) to a nitrate resembling collodium. The greater chemical resistance of animal cellulose observed by BERTHELOT (2) and SCHÄFER (3) was not found by WINTERSTEIN (4) for the highly purified substances. Upon hydrolysis the resulting main monosaccharides, the glucose, from plant and animal cellulose are the same. Furthermore, both celluloses give identical disaccharides, cellobiose (5), tri-, tetra-, and hexa-saccharides (6), and they are enzymatically fermented in the same way (7). Their native crystal lattice was shown to be identically *Cellulose I* by HERZOG and GONELL (8). Animal cellulose is mercerised with sodium hydroxide solutions in the same way as plant cellulose (9).

From the previous investigations reviewed, it is concluded that plant and animal cellulose are identical from a chemical and a structural point of view. In any case no definite difference has been proved using the methods described. In connexion with a research programme on plant cellulose under supervision of Professor THE SVEDBERG (cf. 10 for reviews) it was of interest to study animal cellulose, too.¹

¹ The first communication on the investigations of tunicin was given by the author in a lecture in the Research Laboratory, Svenska Cellulosa AB., Skönsmon, Sweden, on June 3rd, 1951.

The aim of the investigations reported here is to compare the tunicin with plant cellulose using chiefly physico-chemical methods such as electron microscopy and X-ray diffraction. The comparison was difficult because the animal cellulose investigated did not occur as free fibres (cell walls) as did the plant cellulose. The cellulose-containing part of the *Ascidiae*, the mantles, forms a tough, homogenous tissue with about 98–99 per cent water in its native state. This tissue retains its volume and shape and becomes water-clear after treatment with hot dilute aqueous solutions of sodium hydroxide. Hydrolysis with mineral acid breaks down the mantles into irregular pieces.

2. Material investigated

The animal cellulose investigated was isolated from two species of *Ascidiae*.¹

a. *Corella parallellogramma*, taken in Gullmarsfjorden, Bohuslän, Sweden; preserved in formol, oblong, rounded animals of 3–4 cm length and 2–3 cm width, almost colourless and transparent. Each mantle (~1 mm thick) had a wet weight of about 2 g with a dry content of 0.65 per cent (drying at 105° C) and a tunicin content of 0.30 per cent. Five mantles of this species were available for the investigation (~0.03 g tunicin).

b. *Ascidia spp.*² taken in the Bay of Biscay near Santander, Spain, preserved in alcohol, pearshaped animals of about 10 cm length and 6–7 cm width, yellow to brownish. Each mantle (4–8 mm thick) had a wet weight (in alcohol) of 60–80 g with a dry content of 1.7 per cent (drying at 105° C) and a tunicin content of 1.0–1.1 per cent. Four mantles (~2.5 g tunicin) were available.

3. Method of isolation

Since the investigation was directed toward the fine structure (physical properties, morphology) of the tunicin, it was necessary that the methods of isolation and purification be made without swelling, solution, or degradation of the substance. This meant unfortunately that the very efficient methods of ZECHMEISTER and TOTH (6), swelling in conc. hydrochloric acid, were not applicable.

The original mantles of sample a) had a nitrogen content of 2.5 per cent of the dry weight while the b) sample had a 3.0 per cent nitrogen content. The mantles were cut into pieces (slices) of 2–4 mm width and treated with an excess of 1 per cent sodium hydroxide on a boiling water bath. The nitrogen content of the washed, dried residue of sample b) decreased to 0.89 per cent after 5 hours treatment, 0.26 per cent after 10 hours, 0.14 after 15 hours and 0.07 after 20 hours. In the following experiments all the samples used were treated for 20 hours (fresh 1 per cent caustic every fifth hour), the samples washed with water and 2 per cent acetic acid, freeze-dried or stored in absolute alcohol.

¹ The *Ascidiae* were supplied by Docent ÅKE HOLM of The Zoological Institute, University of Uppsala (Head Professor SVEN HÖRSTADIUS). The author is much obliged to Dr. Holm for his kind interest, help and advice in the selection of the biological material.

² These species were classified by Dr. A. ÄRNBÄCK, Naturhistoriska Riksmuseet, Stockholm, and Docent ÅKE HOLM, Uppsala.

4. Mercerisation

It is possible to mercerise tunicin with sodium hydroxide solutions to give the same lattice as plant cellulose (9). These results have been confirmed (Table I) using a Guinier powder camera ($\text{CuK}\alpha$ -radiation, made monochromatic and focussed using a bent quartz crystal). The X-ray reflections of native tunicin are sharper than those of native cotton and much sharper than those of wood cellulose (Fig. 1).

The graphs in Fig. 2 show the photometer curves of X-ray diagrams of partially mercerised and mercerised tunicin. A phase analysis was made independently using a Debye-Scherrer powder camera ($\text{CuK}\alpha$ -radiation). The minimum concentration of sodium hydroxide, necessary for mercerisation of tunicin, is higher than for cotton and wood cellulose (Fig. 3). The difference between cotton and animal cellulose in per cent NaOH is about 3 times the probable experimental error (0.3 per cent).

The X-ray diagrams were obtained for purified tunicin (<0.1 per cent nitrogen), cut into small pieces (<0.5 mm) with a razor blade and pressed into rods of 1 mm diameter (0.8 ± 0.1 mg/mm) for the Debye-Scherrer camera or discs of 1 mm thickness for the Guinier-camera (0.50 ± 0.06 mg/mm²). The phase transition of *Cellulose I* $\rightarrow$ *II* for alkali-treated samples was followed quantitatively from the relative intensity of the 101- and 101-reflections of the native pattern (*I*) and the 101-reflection of the mercerised pattern (*II*) as recently described by the author (11). The relative intensity numbers I_r (Fig. 3) were estimated with an accuracy of about 0.1. As the transition proceeds, the I_r -numbers increase from 0 to 1.

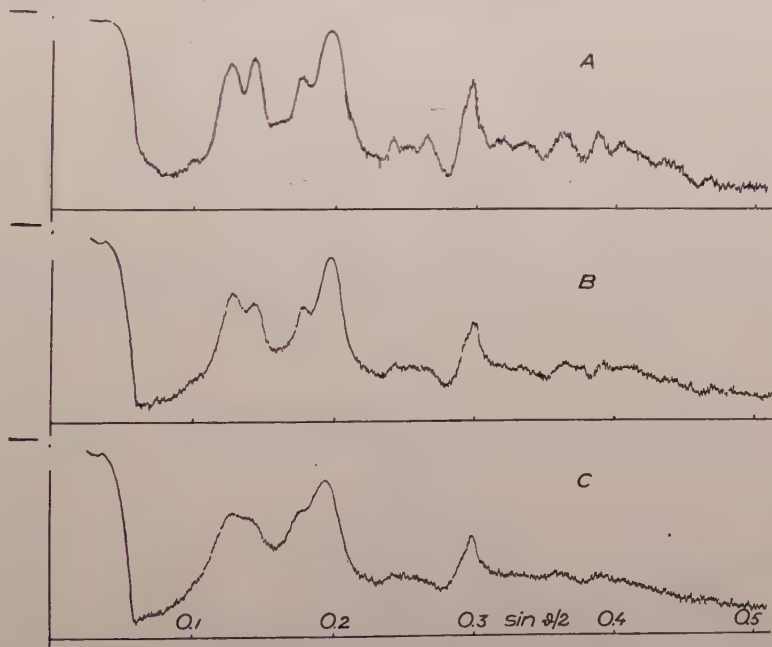


Fig. 1. Photometer curves of X-ray diffraction diagrams (Guinier camera) of A) animal, B) cotton, and C) wood cellulose. The samples B) and C) have been described in ref. (11) as B) and F) resp. Amounts of sample 12.6, 13.9, and 15.8 mg resp. (camera G 1, Philips tube, exp. for 6 hours, 45 kV, 25 mA).

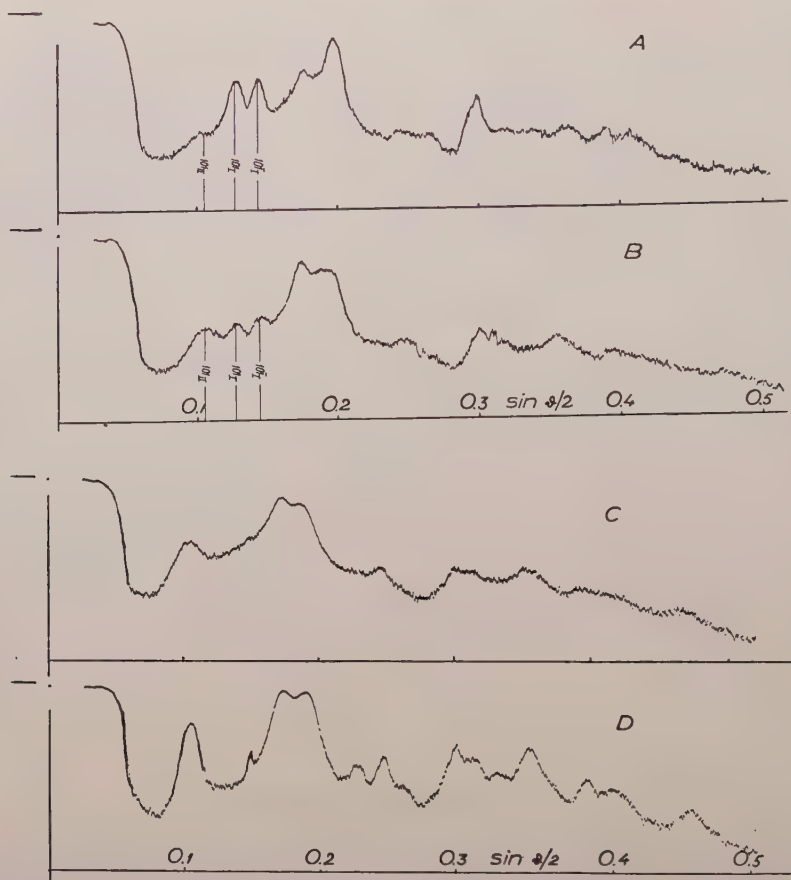


Fig. 2. Photometer curves of X-ray diagrams of A) and B) partially mercerised tunicin (with 9.55 and 10.52 per cent NaOH at 0° C), C) mercerised tunicin (17.8 per cent NaOH), and D) sample C) hydrolysed in boiling 2.5-N H_2SO_4 for 4 hours.

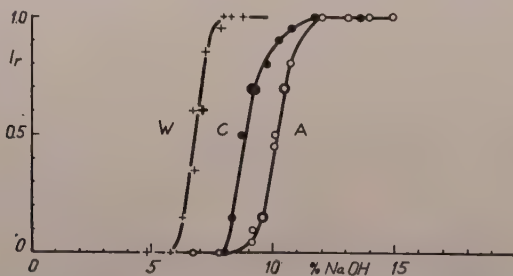


Fig. 3. Transition of *Cellulose I* $\rightarrow$ *II* as intensity numbers I_r vs. concentration of caustic soda for wood, cotton, and animal cellulose. The relative intensity number I_r is = 0 for pure native and = 1 for pure mercerised cellulose (comp. 11).

Table I.

Distances between the lattice planes (in Å) calculated from Guinier-diagrams.

Native Samples					
	(101)	(10 $\bar{1}$)	(120) (021)	(002)	(301) (003) (103)
Indices	A1	A2	II ₁	A4	A8
Tunicin	6.02	5.33	4.34	3.87	2.57
Cotton	5.99	5.33	4.34	3.89	2.57
Mercerised Samples	(101)	(020)	(10 $\bar{1}$)	(002)	
Indices	A0	II ₀	A3	A4	
Tunicin	7.30	5.14	4.45	4.04	
Cotton	7.27	5.17	4.43	4.01	

The reflections have both Miller indices and the common fibre diagram indices. The camera (G 1) was calibrated using sodium chloride.

5. Fine structure

The tunicin has been extensively studied using electron microscopy.

The micrographs were obtained with a Siemens electron microscope (Type ÜM 100, 100 kV, magnetic lenses) using a magnification of 8500 (± 2 per cent) diameters. The specimens were prepared on collodium or formvar membranes (100–200 Å thick determined by weighing on a microbalance) from suspensions in distilled water. It was necessary to disperse the samples in water suspension by ultrasonic irradiation (22 k c, magnetostriction, 1–2 watt per sqcm). The shadow casting was done with gold-manganese (an alloy of equal parts of gold and commercial manganese) at an angle of 1:2 to 1:3 with a layer of 10–15 Å metal (calculated geometrically) on the supporting membrane.

The tunicin contains thin filaments, micelle strings, approximately 100–150 Å in diameter, visible even in the crude mantle tissue, dispersed by ultrasonic irradiation. The strings occur free or in bundles. After purification as described in Section 2 (<0.1 per cent nitrogen) the micelle strings are the only structure element visible

Table II.

Widths of micelle strings (in Å).

Series	Cellulose Sample		
	Wood	Cotton	Tunicin
I	80 (96)	90 (90)	132 (66)
II	76 (66)	87 (30)	108 (72)
III	73 (40)	88 (40)	116 (69)

The number of measured strings are in paranthesis. The probable errors are 10–20 Å (the resolving power of the electron microscope is about 30 Å).

Series I and II are measured by Mrs. ANNA LINDGREN and Series III by Miss ANNA-LISA NORLING.

(Figs. 4 and 5). The tunicin strings are very well defined and fairly stiff (often bending at sharp angles). When the tunicin strings were examined on comparable plates (the same carrier membranes, and shadow casting, and the focussing, exposure and development kept as constant as possible) they appeared thicker and stiffer than those of wood and cotton cellulose (Figs. 6 and 7). These observations have been confirmed by measurements of the string widths made using a microcomparator directly on the plates (Table II).

When the tunicin is mercerised by immersion in 17.8 per cent sodium hydroxide at room temperature for 1 hour and washed in water, the tunicin strings retain the same dimensions but they appear to be considerably disordered (curved, wound in bundles) as shown in Fig. 8. A free string of mercerised tunicin seldom has a linear portion longer than a few tenths of a μ .

After hydrolysis with boiling 2.5-N sulphuric acid (11.4 per cent) for 4 hours the tunicin strings were subdivided into micelles. The micelles from the native tunicin (Fig. 9) are mainly straight needles (lengths from about 0.1 to several μ). The micelles from the mercerised tunicin (Fig. 10) are much shorter (~ 300 Å), i.e. of a length comparable to micelles from mercerised cotton and wood cellulose.

6. Degree of polymerisation.

The degree of polymerisation of nitrated tunicin has been measured viscosimetrically in acetone solution for three samples:

1. Purified, freeze-dried, native tunicin.
2. Sample 1, hydrolysed for 4 hours with boiling 2.5-N sulphuric acid.
3. Sample 1, mercerised with 17.8 per cent sodium hydroxide and hydrolysed as Sample 2.

The samples were dried over solid sodium hydroxide, nitrated with a mixture of nitric acid-phosphoric acid-phosphorous pentoxide (48:50:2) for 6 hours in an ice bath, the acid removed on a glass filtrum (G2) by washing with large amounts of ice cold distilled water. The nitrates were stabilized by heating to 100° C with freshly distilled water for two periods of 2 hours each. The nitrogen content was determined by Dumas' method. The K_m -constants used are those given by JULLANDER (12). The results are presented in Table III.

Table III.

Intrinsic viscosity $[\eta]$ and degree of polymerisation (Z) for nitrates of animal cellulose.

Sample	$\log [\eta]$	$[\eta]$	Nitrogen per cent	$K_m \cdot 10^3$	Z
1	1.566	36.8	13.62	9.6	3 830
2	0.814	6.52	13.43	9.1	720
3	0.633—1	0.430	—	9.4	46

The measurements were made at 20.°00 C with an OSTWALD viscometer: length of capillary 9.0 cm, volume of bulb 1.0 ml, and time of flow for pure acetone 119 sec. No corrections were applied. The $[\eta]$ -values were extrapolated from diagrams ($\log \eta_{sp}/c$, c) by straight lines. c in g/100 ml.

7. Discussion

From recent investigations using electron microscopy, plant cellulose is shown to be built up entirely of thin filaments or strings, micelle strings, of a diameter somewhat less than 100 Å (13). It is further found (14) that the micelle strings are entities, i.e. most probably no chain goes from one string to another, and that the thicker filaments (200–400 Å) reported by some authors (15) can be aggregates of micelle strings.

The animal cellulose has a fine structure closely related to that of plant cellulose.¹ The animal cellulose has the widest micelle strings with a diameter of 120 ± 20 Å, followed with decreasing thickness by cotton and wood. Its X-ray diagram contains the same reflections as plant cellulose but sharper and narrower, indicating a better lattice perfection and/or larger crystalline regions. The minimum concentration of sodium hydroxide necessary for mercerisation is lowest for wood and increasing from cotton to animal cellulose. The degree of polymerisation of nitrated tunicin is high and of the order of magnitude 4 000 as a minimum value. Hydrolysis with hot dilute mineral acid affects the tunicin strings much less than wood and cotton strings, as the strings into which they disintegrate are longer.

All these observations indicate that the micelle strings of animal cellulose have the same general properties as those of plant cellulose. They are thicker and more resistant, however, towards treatments as swelling with lye and hydrolysis with acid. In their native state, the tunicin strings give an X-ray diffraction pattern with sharper and stronger reflections than plant cellulose. However, it is impossible thus far to decide whether the difference between animal and plant celluloses is only an effect of the string dimensions or if the animal cellulose has a better lattice order inside the strings as well.

The author is much indebted to Professor THE SVEDBERG for his stimulating interest in the work and to Professor STIG CLAEßON, the present head of the Institute, for facilities put at the author's disposal.

This work is part of a research programme on cellulose under the supervision of Professor THE SVEDBERG and financially supported by the Swedish Cellulose firms Billeruds AB., Mo och Domsjö AB., Stora Kopparbergs Bergslags AB., Svenska Cellulosa AB., and Uddeholms AB.

The X-ray exposures using Guinier cameras were made in the Chemical Institute, with the kind permission of Professor GUNNAR HÄGG, to whom the author is grateful.

Institute of Physical Chemistry, University of Uppsala, Sweden.

REFERENCES.

1. C. SCHMIDT, *Liebigs Annalen* **54**, 284–330 (1845), esp. p. 286 and 318–20.
2. M. BERTHELOT, *Compt. rend.* **47**, 227–30 (1858); *Annales de Chimie et de Physique* **56**, 149 (1859).
3. A. SCHÄFER, *Liebigs Annalen* **160**, 312–29 (1871).
4. E. WINTERSTEIN, *Ber. dtsch. chem. Ges.* **26**, 362–64 (1893); *Zschr. physiol. Chem.* **18**, 43–56 (1894).

¹ When most of the experiments for this investigation were completed a note on electron microscopy of animal cellulose appeared (K. H. MEYER, L. HUBER, E. KELLENBERGER, *Experientia* **7**, 216 (1951)), reporting flattened strings of 200 Å width.

B. G. RÅNBY, *Physico-chemical investigations on animal cellulose (Tunicin)*

5. E. ABDERHALDEN, G. ZEMPLÉN, Zschr. physiol. Chem. **72**, 58-62 (1911).
6. L. ZECHMEISTER, G. TÓTH, Zschr. physiol. Chem. **215**, 267-76 (1933).
7. W. GRASSMANN, L. ZECHMEISTER, G. TÓTH, R. STADLER, Annalen der Chemie **503**, 167-179 (1933).
8. R. HERZOG, H. W. GONELL, Zschr. physiol. Chem. **141**, 63-67 (1924).
9. R. SUTRA, Compt. rend. **195**, 181 (1932). — Cf. E. TREIBER, Protoplasma **XL**, 390-91 (1951).
10. THE SVEDBERG, Svensk Papperstidning **45**, 444 (1942), **52**, 157 (1949). J. Phys. Colloid Chem. **51**, 1 (1947).
11. B. G. RÅNBY, Acta Chem. Scandinavica **6**, 116 (1952).
12. I. JULLANDER, Ark. Kemi Min. Geol. **21 A**, No. 8 (1945).
13. B. ERIKSSON and S. SÄVERBORN, Acta Agricult. Suecana **16**, 234 (1946). — B. G. RÅNBY and E. RIBI, Experientia **6**, 12 (1950). — A. J. HODGE and A. B. WARDROP, Aust. J. Sci. Res. **B 3**, 265 (1950).
14. B. G. RÅNBY, Faraday Society Discussions, July 1951, No. **11**, 158 (1951).
15. A. FREY-WYSSLING, K. MÜHLETHALER, and R. G. WYCKOFF, Experientia **4**, 475 (1948). — R. D. PRESTON, E. NICOLAI, R. REED, and A. MILLARD, Nature **162**, 665 (1948). A review in R. W. G. Wyckoff, Electron Microscopy, Chapt. IX, New York 1949.

Tryckt den 27 mars 1952

Uppsala 1952. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

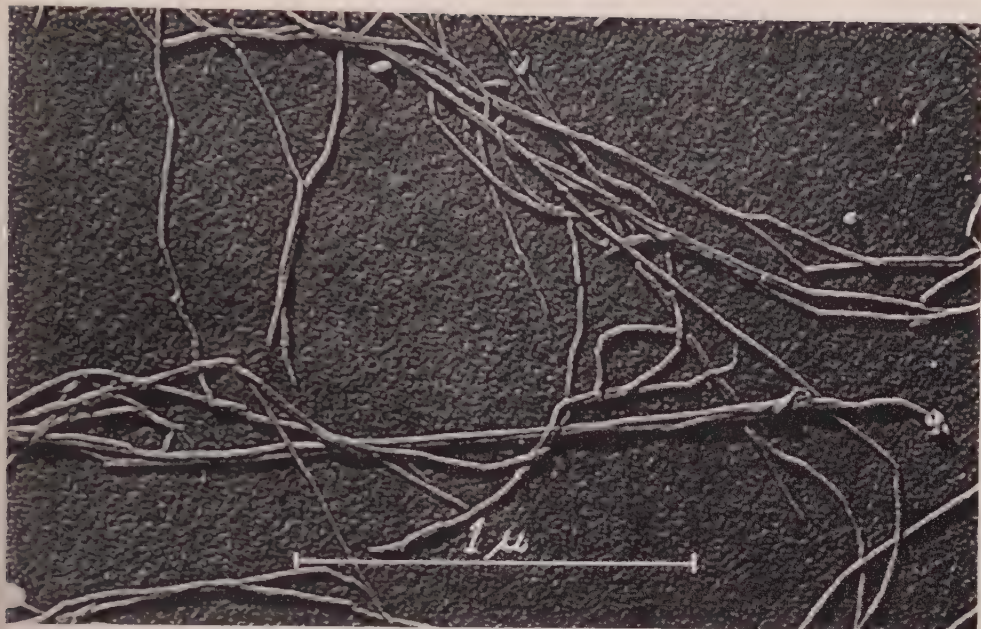


Fig. 4.

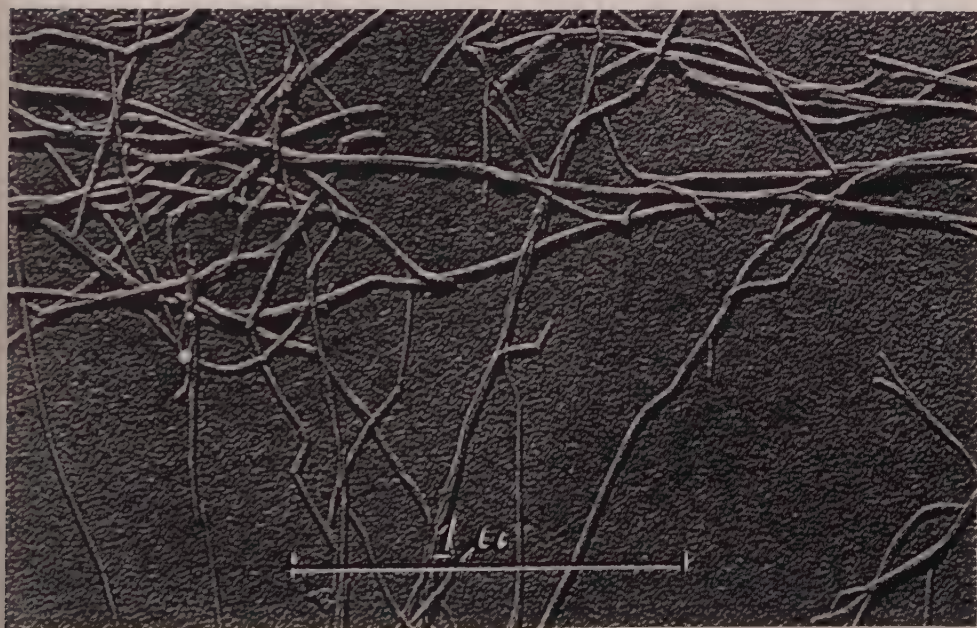


Fig. 5.

Figs. 4 and 5. Electron micrographs of purified tunicin from a) *Corella parallellogramma* and b) *Ascidia* spp. disintegrated by ultrasonic irradiation. Magnification 51 000 $\times$.

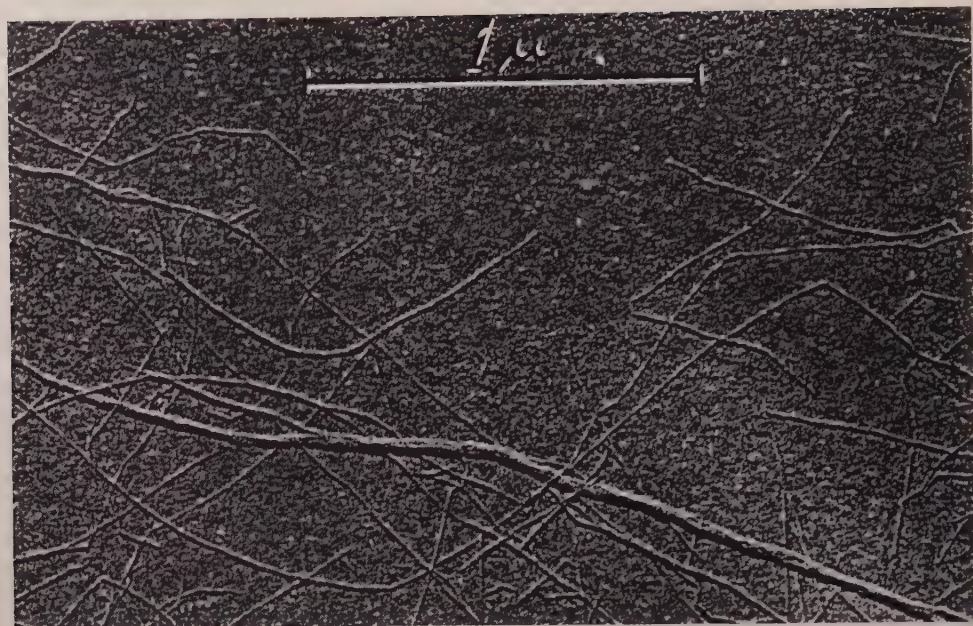


Fig. 6.

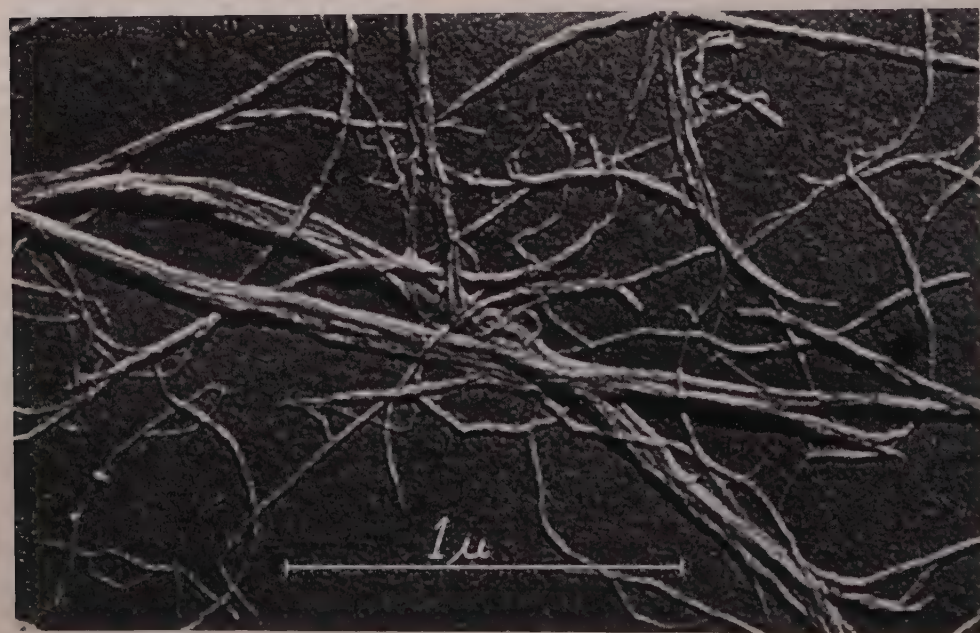


Fig. 7.

Figs. 6 and 7. Disintegrated wood and cotton cellulose.



Fig. 8. Mercerised, disintegrated tunicin from species b).



Fig. 9.

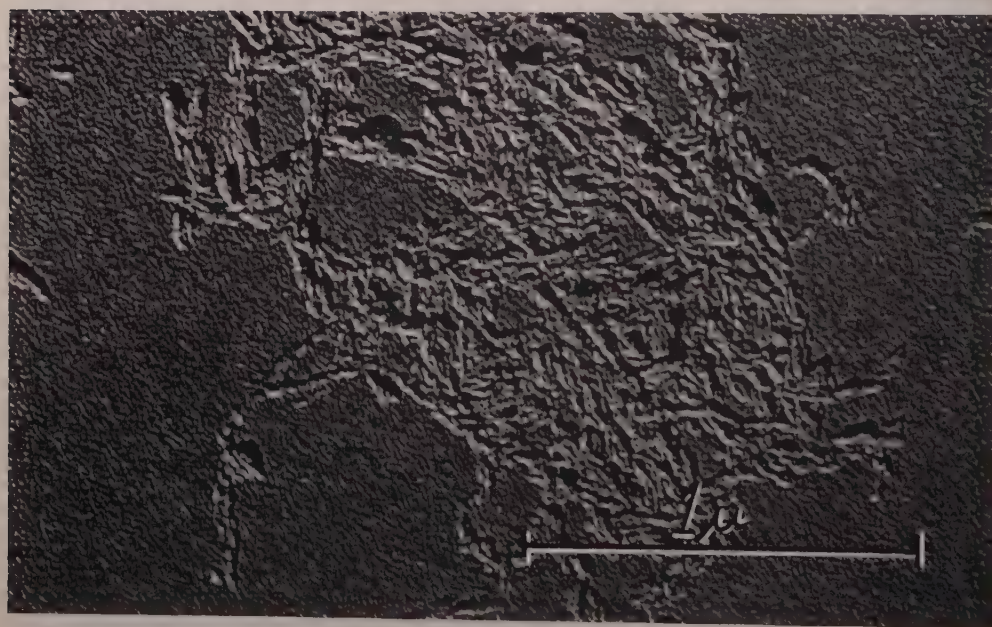


Fig. 10.

Figs. 9 and 10. Micelles from native (never dried) and mercerised tunicin (species b) respectively, after hydrolysis for 4 hours with boiling 2.5-N H_2SO_4 .

Physico-chemical investigations on bacterial cellulose

By BENGT G. RÅNBY

With 2 plates and 5 figures in the text

1. Introduction

Since 1886 it has been known that the peculiar tough slimes, lumps, or membranes ("vinegar plant" or "Essigmutter") formed by bacteria in acid wine or a similar medium, contain cellulose (1). Further work has shown that there is a very small, if any, chemical difference between bacterial and plant cellulose (2, 3). The X-ray diffraction diagrams were also identical both for the native (4, 5) and the mercerised (6) cellulose.

The cellulose-forming bacteria, especially *Acetobacter xylinum* as test organism, has been investigated under different growth conditions to elucidate the mechanism of cellulose formation. In general, bacterial cellulose can be formed from hexoses or related substances, which can be converted into hexoses by the bacterial action (7). The resulting cellulose is mainly extracellular strings of submicroscopic dimensions forming a network with the bacteria inside (8). The formation has been studied further by MÜHLETHALER (9) using electron microscopy and metal shadow casted specimens. He observed the bacteria in different stages of the membrane development and concluded that the bacteria first secreted a structurally homogeneous slimy substance within which cellulose strings of the diameter ca. 250 Å could be seen forming. The substance secreted appeared to be a precursor of cellulose whose polymerisation was assumed to proceed outside the organisms.

In connexion with a research programme on plant cellulose, performed at the Institute (cf. reviews by SVEDBERG (10)) it was of interest to investigate bacterial cellulose for comparison. A similar study of animal cellulose was described in a preceding paper (11).

2. Preliminary experiments

Some test experiments were performed to check the string diameter of ca. 250 Å reported for bacterial cellulose (9). A small sample (~ 0.05 g) produced by *Acetobacter xylinum* and purified for use as osmotic membrane (12) was available.¹

Electron micrographs of the sample disintegrated in water suspension using ultrasonic irradiation indicated a primary string diameter of about 100 Å (± 20 Å) rather

¹ The author is much indebted to Mrs. ELIZABETH ENOKSSON, Research Assistant of this Institute, for her kindness in supplying this sample.

than 250 Å. After hydrolysis in boiling 2.5-N sulphuric acid the strings were subdivided into rodlike pieces, micelles, of an average length from 1 000 to 2 000 Å. According to these observations, the bacterial cellulose strings have dimensions and properties intermediate between cotton (13) and animal cellulose (11).

Electron micrographs of bacterial cellulose strings mainly free (Fig. 1) and in bundles (Fig. 2) appear very similar to cotton linters strings (Fig. 3) on comparable plates. Fig. 4 shows micelles from hydrolysed bacterial cellulose (after drying treated in the boiling acid for 4 hours).

3. Production of bacterial cellulose

To obtain greater amounts of bacterial cellulose, a strain of *Acetobacter xylinum* was cultivated in a nutrient solution, rich in carbohydrates, according to ASCHNER'S (14) method.¹

12.5 g commercial yeast extract,
12.5 g Casamino acids (Difco),
12.5 ml acetic acid,
200 g sucrose,

were added to 5 litres of tap water. The solution was autoclaved (1.2 atm., 15 min.), and after cooling, 100 ml alcohol (99.5 per cent) were added. The solution was then poured into 300 ml sterile cotton-stoppered Erlenmeyer flasks (25 flasks, 200 ml into each) and inoculated with a strain of *Acetobacter xylinum* (N C I B 8246, from the Chemical Research Laboratory, Teddington, Middlesex, England) and grown at 30° C. The growth was rapid and after one day the typical grey membranes hanging at the surface were observed. The first harvest of about 10 mm thick, porous membranes was made after 3 days. The membranes from the second and third harvests (8 and 16 days after inoculation) were more compact (had no pores or bubbles) and were tougher. All these membranes included two thirds of the original volume of nutrient solution.

The membranes were washed in running tap-water overnight and then treated on a boiling water bath in 1 per cent sodium hydroxide in a nitrogen atmosphere for 15 hours (fresh lye after 5 hours) to remove impurities. After washing out the lye, the membranes retained their volume and shape (~ 0.5 per cent dry weight). A considerable shrinkage was caused simply by freezing and melting the water-swelled membranes. In this state, the wet membranes (~ 10 per cent dry weight) were freeze-dried, forming thin, yellow tinged translucent sheets. The nitrogen content of the dry substance (105° C, 3 hours), determined by Kjeldahl-analysis, was 6.0 per cent of the dry weight of the original washed membranes and 0.26–0.33 per cent of the alkali-treated membranes. When the membranes were again treated on the water bath with 1 per cent lye for 5 hours, washed and freeze-dried, the nitrogen content was only 0.11 per cent. The total yield of purified bacterial cellulose was 7 g.

4. X-ray investigation

X-ray powder diagrams of native and mercerised, bacterial cellulose were obtained using a Guinier powder camera built by Professor G. HÄGG (Cu K α -radiation, made monochromatic and focussed using a bent quartz crystal).

The X-ray specimens were prepared from the purified bacterial cellulose membranes, cut into small pieces (~ 0.5–1 mm), pressed into discs (0.75 $\pm$ 0.1 mg/mmsq)

¹ With the kind permission of Professor ELIAS MELIN, Head of the Institute of Physiological Botany, University of Uppsala, the bacterial cellulose was produced in his laboratory with the competent technical assistance of Mrs. M. UDRIS.

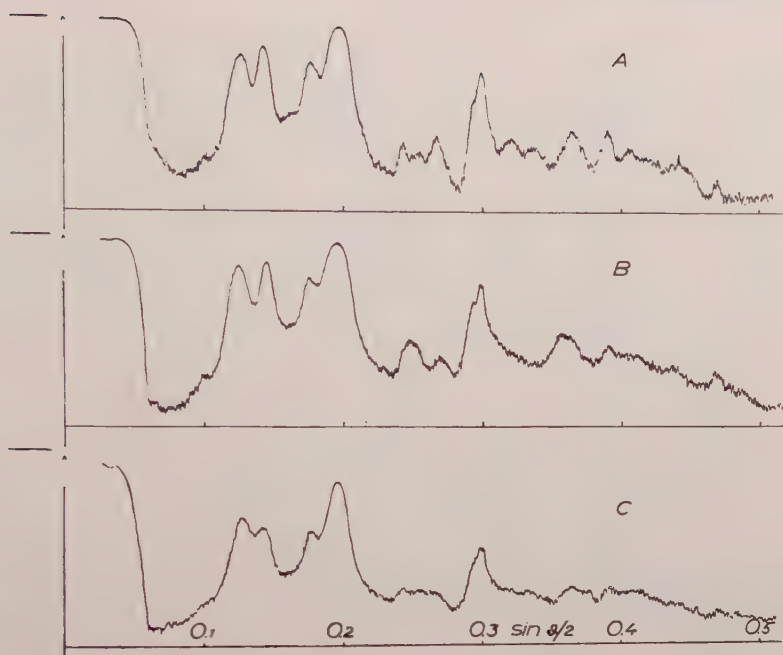


Fig. 5. Photometer curves of X-ray diffraction diagrams of native animal (A), bacterial (B), and cotton (C) cellulose. The animal cellulose (A) has been described in ref. (11) and the cotton cellulose (C) in ref. (15) as sample (B). The specimens contained 12.8, 16.7, and 13.9 mg resp. Camera G 1. All exposures 6 hours (Philips tube, 45 kV, 25 mA).

in the specimen holders, and exposed in the beam without supporting membranes (15). The X-ray reflections of the native sample are resolved better than those of cotton linters but not as well as those of animal cellulose (Fig. 5). There is a shift in the relative intensities of some of the bacterial cellulose reflections as compared to

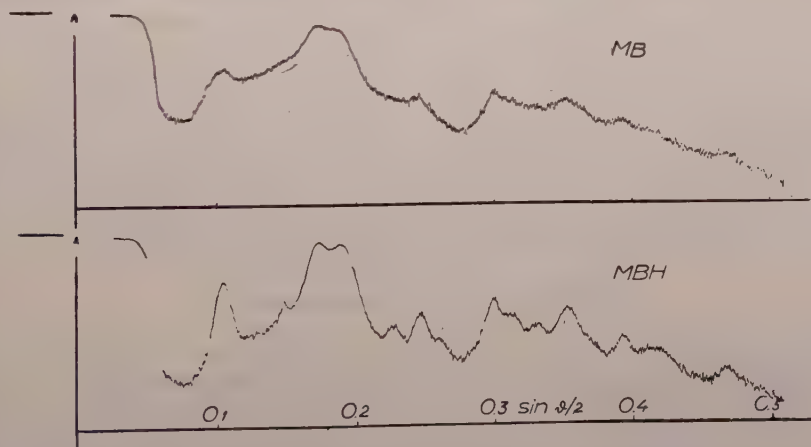


Fig. 6. X-ray diagrams of MB) mercerised bacterial cellulose and MBH) sample MB) hydrolysed for 4 hours in boiling 2.5-N sulphuric acid. The sample was mercerised without previous drying.

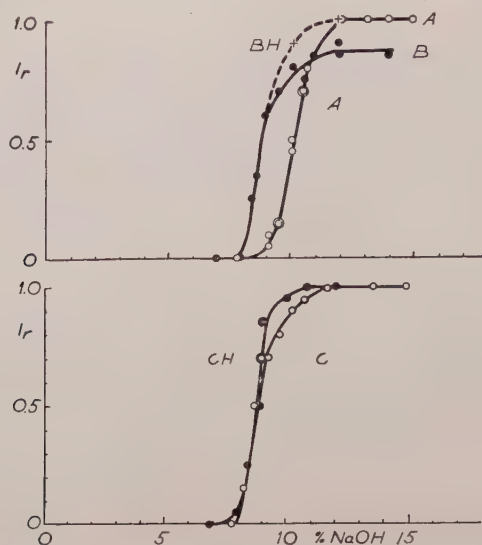


Fig. 7. Transition of *Cellulose I* $\rightarrow$ *II* as relative intensity numbers I_r vs. concentration of caustic soda, for animal (A), bacterial (B), and cotton (C) cellulose. H-samples are hydrolysed.

tunicin, for instance the three reflections at $\sin \vartheta/2 = 0.25$ – 0.27 . This effect has not yet been explained. It might be related to orientation in the specimen. The X-ray diffraction diagram of mercerised bacterial cellulose contains the normal reflections of *Cellulose II*, more sharply resolved after hydrolysis as in the case of mercerised animal cellulose (11).

A phase analysis of the transition of *Cellulose I* $\rightarrow$ *II* was made using a series of samples, treated in an ice-bath with sodium hydroxide solutions of concentrations ranging from 5 to 14 per cent (15). The phase transition was followed quantitatively by the relative intensities of the 101- and 101-reflections of the native pattern *I* and the 101-reflection of the mercerised pattern *II* as recently described by the author (15). The relative intensity numbers I_r are plotted in the graphs of Fig. 7 and compared with those of cotton linters (C and CH) and animal cellulose (A). $I_r = 0.0$ means pure native and 1.0 pure mercerised cellulose. The transition of the original, bacterial cellulose is not complete even in 14 per cent lye. After hydrolysis (BH of Fig. 7), which was found to promote the completion of the transition for cotton and wood celluloses (15), the bacterial cellulose was completely mercerised at 12 per cent.

The diagrams of Fig. 7 show that bacterial and cotton cellulose have about the same transition intervals, but different from that of animal cellulose.

5. Water sorption measurements

The water sorption at 65 per cent relative humidity (in a desiccator over 36.3 per cent sulphuric acid) was measured for the alkali-treated samples of bacterial cellulose, described in Sect. 4. The results have been plotted in the graphs of Fig. 8 together with analogous measurements for a cotton cellulose sample. The rapid increase in the water sorption starts at about 7 per cent and ends at about 10 per cent lye for both samples.

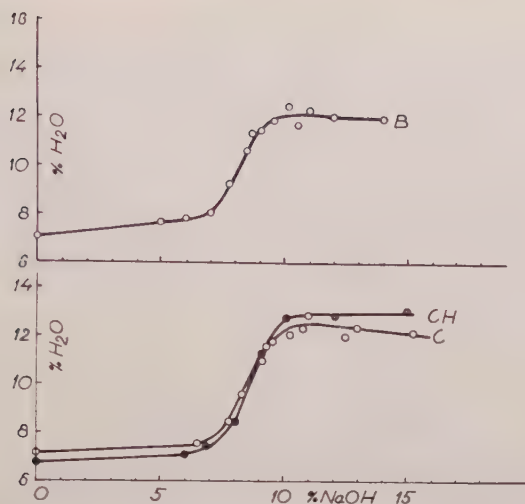


Fig. 8. Water sorption of bacterial (B) and cotton (C and CH) cellulose *vs.* concentration of caustic soda.

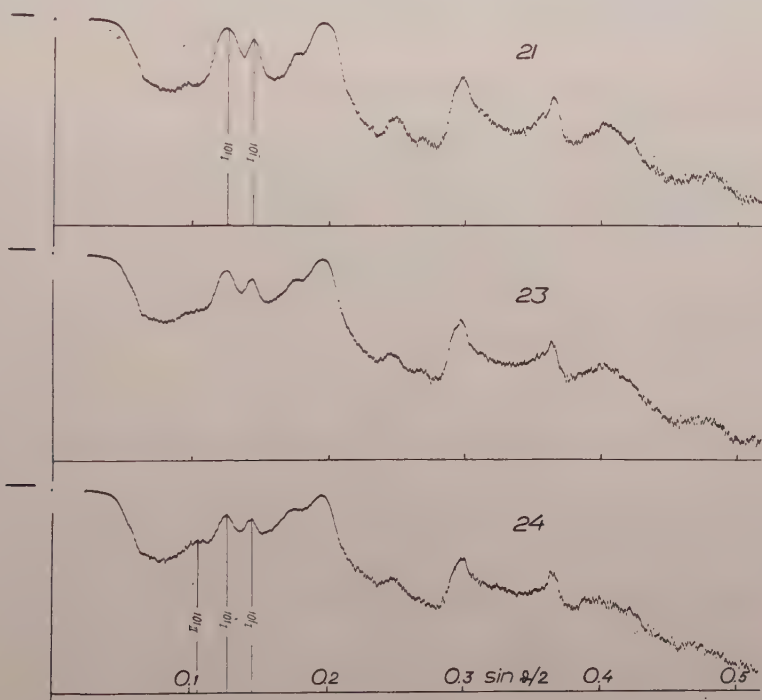


Fig. 9. X-ray diagrams of bacterial cellulose treated with 7.00 (21), 7.85 (23) and 8.48 (24) per cent caustic soda. The specimens contained 100.0 (21), 99.9 (23), and 95.7 mg (24) bacterial cellulose. Guinier camera G 2.

It is obvious from a comparison of the diagrams in Fig. 7 and 8 that the rapid increase in water sorption starts at a caustic concentration which is about 1 per cent lower than where mercerisation is first observed in the X-ray diagrams. This effect was observed and discussed for wood and cotton celluloses (15). In this case the X-ray diagrams (Fig. 9) give an indication of a possible interpretation. The sample treated with 7.85 per cent lye has weaker reflections and more intense background scattering than that treated with 7.00 per cent (pure native). With 8.48 per cent lye the (101)_{II}-reflection is first clearly observed. It is then reasonable to assume that the first effect of the alkali on the cellulose is a partial transition into X-ray amorphous state. Perhaps some of the chains at the surface of the strings are affected, causing a considerable increase in the water sorption.

6. Degree of polymerisation

The degree of polymerisation of nitrated bacterial cellulose has been measured in acetone solution with Ostwald capillary viscometers for four samples:

1. Purified, freeze-dried, native bacterial cellulose.
2. Sample 1, hydrolysed for 4 hours with boiling 2.5-N sulphuric acid.
3. Purified bacterial cellulose, never frozen or freeze-dried, cut into pieces (2–3 mm), treated with cold acid for 4 hours (to dialyse acid into the gel) and with fresh boiling acid for 4 hours.
4. Sample 1, mercerised with 17.8 per cent sodium hydroxide for 2 hours and hydrolysed as Sample 2.

All samples were dried over solid sodium hydroxide, nitrated with a mixture of nitric acid–phosphoric acid–phosphorous pentoxide (48:50:2) for 6 hours in an ice bath, the acid removed on a glass filtrum (Jena G 2) with 50 per cent acetic acid of about -10°C , washed with water, stabilized by heating to 100°C with freshly distilled water for two periods of 2 hours each. The nitrogen content was determined by Dumas' method. The K_m -constants used are those given by JULLANDER (16). The results are presented in *Table I*.

Table I

Intrinsic viscosity $[\eta]$ and degree of polymerisation (Z) for nitrates of bacterial cellulose.

Sample	$[\eta]$	N per cent	$K_m \cdot 10^3$	Z
1	24.2	13.47	9.2	2 630
2	2.62	—	10.0	260
3	3.47	13.84	10.8	320
4	0.455	—	10.0	45

On the performance of the measurements cf. ref. (11), Section 6.

SUMMARY

Bacterial cellulose produced by *Acetobacter xylinum* has been investigated using electron microscopy and X-ray diffraction. After purification it contains thin filaments, micelle strings, of a diameter about 100 Å, as the only structure element. Hydrolysis in boiling 2.5-N sulphuric acid causes a disintegration of the strings into rodlike micelles of varying lengths. Analysis of the phase transition of *Cellulose I* → *II* (mercerisation by caustic soda) using X-ray diffraction and water sorption has shown that bacterial cellulose has transition properties very similar to those of cotton cellulose but different from those of animal cellulose.

The author is much indebted to Professor THE SVEDBERG for his stimulating discussions and to Professor STIG CLAEßSON, the present head of the Institute, for facilities put at the author's disposal.

This work is part of a research programme on cellulose under the supervision of Professor THE SVEDBERG and financially supported by the Swedish cellulose firms Billeruds AB., Mo och Domsjö AB., Stora Kopparbergs Bergslags AB., Svenska Cellulosa AB., and Uddeholms AB.

The X-ray work for this investigation was performed in the Chemical Institute of the University, with the kind permission of Professor GUNNAR HÄGG, to whom the author is grateful.

Institute of Physical Chemistry, University of Uppsala, Sweden.

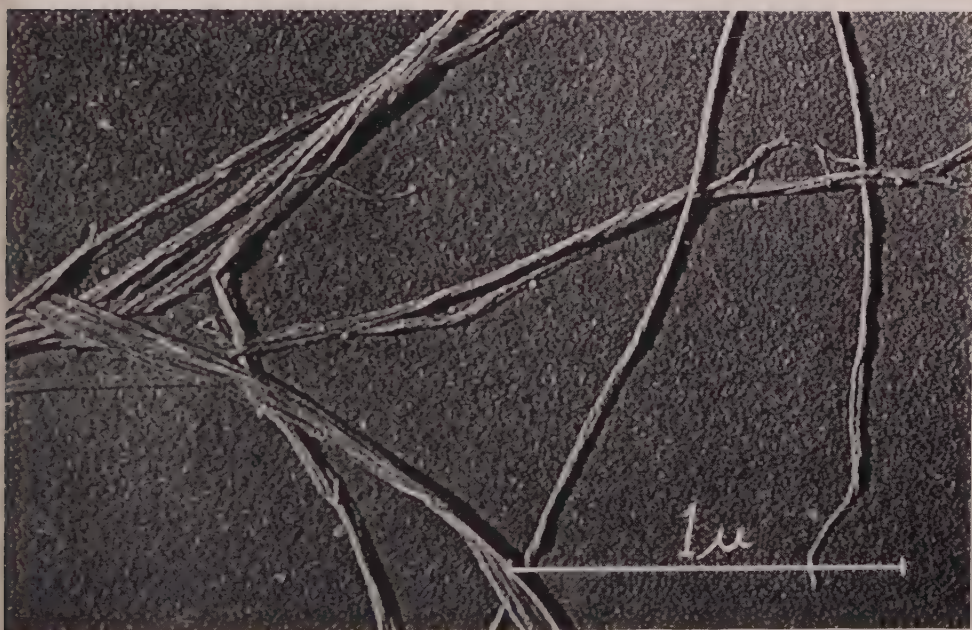
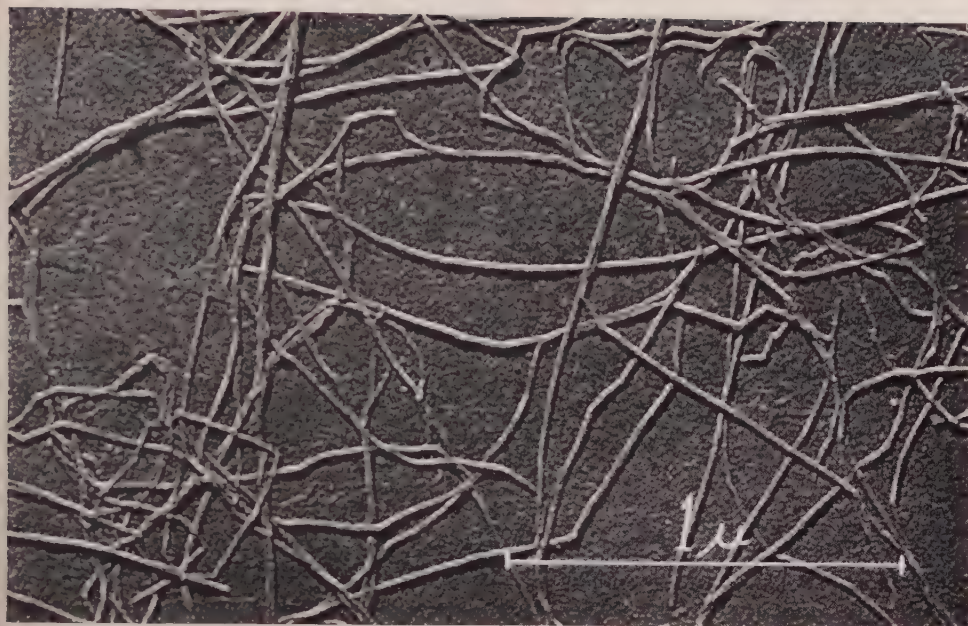
REFERENCES

1. A. J. BROWN, J. Chem. Soc. (London) 49, 172, 432 (1886), 51, 643 (1888).
2. C. v. WISSELINGH, Chem. Zentr. 21, 522 (1917).
3. H. HIBBERT *et al.*, Science 71, 419 (1930), J. Amer. Chem. Soc. 53, 3907 (1931), Can. J. Research 5, 580 (1931), 10, 170 (1934). Cf. J. R. PORTER, Bacterial Chemistry and Physiology, New York, London 1946, p. 382.
4. H. MARK, and G. v. SUSICH, Z. physikal. Chem. B 4, 431 (1929).
5. J. EGGERT, and F. LUFT, Z. physikal. Chem. B 7, 468 (1930).
W. A. SISSON, J. Phys. Chem. 40, 343 (1936).
6. R. SUTRA, Compt. rend. 195, 181 (1932).
7. H. L. A. TARR, and H. HIBBERT, Can. J. Research 4, 372 (1931).
G. A. BROSSA, Ann. Microbiol. 2, 77, 150 (1942).
8. E. FRANZ, and E. SCHIEBOLD, J. makromol. Chem. 1, 4 (1943).
9. K. MÜHLETHALER, Biochim. Biophys. Acta 3, 527 (1949).
10. THE SVEDBERG, Svensk Papperstidning 45, 444 (1942), 52, 157 (1949). J. Phys. Colloid Chem. 51, 1 (1947).
11. B. G. RÄNBY, Arkiv Kemi 4, No. 13 (1952).
12. C. R. MASSON, and H. W. MELVILLE, J. Pol. Science 4, 323 (1949).
13. B. G. RÄNBY, and E. RIBI, Experientia 6, 12 (1950).
14. M. ASCHNER, J. Bacteriol. 33, 249 (1937).
15. B. G. RÄNBY, Acta Chem. Scand. 6, 116 (1952).
16. I. JULLANDER, Ark. Kemi, Min. Geol. 21 A No. 8 (1945), p. 101.

Tryckt den 27 mars 1952

Uppsala 1952. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB





Figs. 1 and 2. Electron micrographs of bacterial cellulose strings dispersed with ultrasonic waves, shadowed with Gold-Manganese (Magnification in Figs. 1-4 is $51\,000\times$).



Fig. 3. Cotton cellulose, dispersed and shadowed.



Fig. 4. Micelles from bacterial cellulose, hydrolysed for 4 hours in boiling 2.5-N sulphuric acid, dispersed and shadowed.

The moving boundary systems in the electrode compartments in electrophoresis

By INGER BRATTSTEN

With 8 figures in the text

In electrophoretic measurements of ionic mobilities two conditions are fundamental. First, the experimentally determined mobility should be related to a definite liquid phase, that is, the specific characteristics of the solution in which the displacement of a certain ion is recorded must not change during the migration. Sufficient quantities of the liquid must therefore be present to exclude foreign ions from the separation zone. Second, the frame of reference must be defined. When the displacements are measured primarily relative to the apparatus, they include the movement of the liquid system in addition to the electrical migration. In order to obtain the data of the electrical migration only, the processes which cause solvent movement must be understood and controlled as far as possible. This is of course especially important in analytical work, but, in general, the same considerations apply to the methods of preparative electrophoresis, although the aspects are here somewhat different. The easy localization of the components to be isolated and a minimum of dilution and backmixing requires control and time constancy of the factors mentioned.

The apparatus used in various types of electrophoretic work have been reviewed in articles such as those by PRAUSNITZ and REITSTÖTTER (1), ABRAMSON, MOYER and GORIN (2), and SVENSSON (3). With special regard to the electrodes and electrode compartments different lines of development have been followed. In the analytical Hittorf method the displacements are measured relative to a given quantity per weight of the solution, and inert electrodes are generally suitable because they do not introduce other ions than the hydrogen and the hydroxyl ions, which in most instances do not interfere with the analyses. In moving boundary methods of determining transference numbers the volume displacements relative to the cell are observed, and reversible electrodes possess the advantage that one side of the apparatus can be kept closed during the experiment, which facilitates the control of certain liquid movement processes. For instance, hydrostatic pressure differences are compensated by the development of counterpressures instead of giving rise to a liquid flow through the apparatus. The same is true of electroosmotic pressure differences which may develop when the separation is performed in a capillary system. The volume shift due to the electrochemical processes need only be considered for the electrode in the closed part of the apparatus. This arrangement was proposed by LEWIS (4) and has been used in accurate determinations of transference numbers

for instance by LONGSWORTH (5, 6). If a relatively high electrochemical capacity is needed, reversible electrodes of the silver-silver halide type must be made rather heavy, and in preparative work the use of inert electrodes is often more convenient.

The capacity of the electrode compartments must be chosen according to the number of coulombs to be passed in one experiment and the nature of the processes at the electrodes. The electrical migration takes place at the velocity ui/κ , which gives the volume displacement per unit time of an ion of the mobility u in a medium of the conductivity κ ; i is the current. The ions involved in the electrode reactions are generally different from those in the bulk of the solution, or at least they differ in concentration. Therefore, moving boundary systems tend to develop in the electrode compartments during electrophoresis. These moving boundary systems may be expected in many instances to be gravitationally unstable or contain blurred boundaries. In such cases the electrical migration only accounts for part of the displacement, which is enhanced by the processes of liquid streaming and free diffusion. With inert electrodes, for example platinum foils, greater volumes are generally needed between the electrodes than with any other type of electrodes, because the hydrogen and hydroxyl ions are faster than all other ions. In addition, their appearance in moving boundary systems is very often accompanied by negative density gradients. To reduce convection streamings and the stirring of the solution by the gas bubbles from inert electrodes, not only the size but also the shape of the electrode compartments is important. Other means of regulating the transfer of ions are provided by factors that influence the ratio u/κ , mainly the ionic strength. TISELIUS has stated that the introduction of a zone of concentrated buffer in the electrode compartment is equivalent to a certain increase of the volume between the electrode and the separation zone (7).

In TISELIUS' method of analysing proteins by moving boundary electrophoresis buffer systems of the ionic strength 0.1–0.2 and silver-silver chloride electrodes are used (8). The electrode tubes originally designed by TISELIUS have proven satisfactory under standard conditions and are still in use. With more dilute solutions, however, their capacity may be too low. For example, when certain buffer systems of the ionic strength 0.03 were used in the apparatus, wrong mobilities were obtained. During the experiments the conductivity in the *U*-tube increased due to the arrival of chloride ions. The rate of transport of these ions was much greater than that corresponding to ionic migration only. The current was kept sufficiently low to exclude disturbances from thermal convection. It was concluded therefore that gravitationally unstable boundaries developed in the electrode vessels. The foreign ions could easily be excluded from the *U*-tube by the insertion of cotton packings in the electrode tubes, which eliminated or reduced the convection transport. In spite of this, an unusually great spreading of the transference values remained, indicating irregular volume changes somewhere in the system, possibly accompanying the reactions in the electrode tubes. Even if such effects are probably much less pronounced when more concentrated solutions are used, the evidence from these experiments stresses the importance of knowing, in accurate work, what reactions take place in the peripheral parts of the system. The experiments presented here were designed to give some information in this respect. Because of the importance of the protein analysis method, such concentrations were chosen which are used there rather than more dilute ones. By forming liquid boundaries in the *U*-tube between 1M NaCl and some typical buffer solutions, the processes in the electrode com-

partments could be reproduced and studied optically. The optical patterns have been compared with the concentration distribution computed for these systems. Although referring to the conditions stated, the characteristics of these experiments can be generalized and used to throw some light upon the conditions in various other types of system.

Experimental

The moving boundary systems between 1M NaCl and the following buffer solutions as supernatants were investigated.

Acetate buffer; Na^+ , H^+ , Ac^- , $\mu = 0.1$, pH = 3.84.

Acetate buffer; Na^+ , H^+ , Ac^- , $\mu = 0.2$, pH = 4.63.

Citrate buffer; Na^+ , Li^+ , H^+ , C_i^{3-} , F^- , $\mu = 0.2$, pH = 4.94.

Phosphate buffer; Na^+ , H^+ , HPO_4^{2-} , $\mu = 0.1$, pH 6.83.

Phosphate buffer; Na^+ , H^+ , HPO_4^{2-} , $\mu = 0.2$, pH = 6.83.

Veronal buffer; Li^+ , H^+ , V^- , Cl^- , $\mu = 0.1$, pH = 8.85.

Veronal buffer; Li^+ , H^+ , V^- , Cl^- , $\mu = 0.2$, pH = 8.89.

Veronal buffer; Na^+ , V^- , F^- , $\mu = 0.2$, pH = 8.98.

Borate buffer; Na^+ , $\text{B}_4\text{O}_7^{2-}$, $\mu = 0.2$, pH = 9.23.

Here Ac^- is used for the acetate ion, V^- for the veronal ion, and C_i^{3-} for the citrate ion.

The experiments were performed in the analytical moving boundary apparatus according to TISELIUS (8) and SVENSSON (9). Short cells were used, the lower segments of which were filled with the sodium chloride solution. The initial boundaries were brought into the field of vision by slow liquid movement, and the current applied. The moving boundary system in the positive limb of the U -tube corresponds to that in the cathode compartment and the system of the negative limb to that in the anode compartment. The inclined slit method for observation of the boundaries was used. The optical patterns were supplemented with chemical and conductometric analyses of certain fractions of the liquid in the cell. The optical diagrams of these moving boundary systems are shown in the Figures 1 a–8 a. Here, the first line gives the positive limb with plus to the left, and the second line the negative limb with minus to the left.

The interpretation of the optical patterns

If the effect of negative density gradients is disregarded, the boundary systems outlined in the Figures 1 b–8 b are expected to develop. In these figures a dashed line indicates a blurred boundary, stationary boundaries are marked by δ , and arrows indicate the direction of the current. The liquid phases are numbered from the top to the bottom of the channel; when necessary + or - are added to the numbers to indicate the positive or negative limb.

The Tables 1–6 give the computed composition of these systems. The second column contains the equivalent concentrations, and in the third column these figures are recalculated to give the salt content per liter solution. Since rather great concentration gradients are involved, and because of the uncertainty in the calculations, these quantities are used instead of the densities in the interpretation of the results.

The treatment of the boundary systems is based on evidence from an experimental investigation of weak electrolytes in moving boundary electrophoresis, which included a detailed study of certain buffer substances (unpublished material). The numerical computations have been performed with the aid of the moving boundary equation and the equations derived by DOLE (10). A brief account of the particular experiments is given below. In order to avoid reiterations, certain features which are common to all these systems have been abstracted and are treated first.

The influence of the hydrogen and hydroxyl ions. In all cases the upper phase contains a weak electrolyte, whereas the bottom phase does not. Due to the presence of weak acids the hydrogen and the hydroxyl ions are automatically constituents of the systems. The passage of current through a buffer solution situated between two liquid phases containing strong electrolytes only will generally result in pH and equilibrium shifts at the phase boundaries, due to the migration of the hydrogen ion constituent to the cathode and the buffer anion and, at high pH values, the hydroxyl ion constituents towards the anode. The splitting of the weak acid complexes in the phase boundaries is greater the higher the mobility of the free anions and the lower their affinity to the hydrogen ion. The buffer capacities of the weak acids used here approximately cover the pH range 4–9, according to their pK_a values, and the boundary systems therefore develop systematical dissimilarities.

In the cathode vessel (positive limb), the weak electrolyte ions ascend from the initial boundary into the buffer solution followed by a fast strong electrolyte ion. The pH of the adjusted solution below the rising boundary is lower than in the buffer. Under these conditions strong and moderately strong acids separate from the initial boundary but with weaker acids the immobile, undissociated form is fixed in the moving boundary, and the separation from the initial boundary becomes incomplete. Citric acid and phosphoric acid separate completely from the initial boundary. Citric acid has not been systematically investigated in moving boundary systems, but the three pK_a values are fairly close, and it is probable that the withdrawal involves only one discontinuity. The three pK_a values of phosphoric acid are widely separated, and the mobility of the divalent anion is about twice as great as that of the monovalent anion. In the phosphate solutions used here the buffer capacity is due to the equilibrium between these two ions, and the withdrawal takes place *via* two discontinuities separated by a layer where the monovalent ion prevails. In the acetate and veronal buffers the free acid does not disappear from the stationary boundary. The borate ion belongs to a still weaker type of acid, the dissociation of which is complete only in the high alkaline range. Not much is known about this acid in moving boundary systems, but a complementary experiment, where the chloride ion was placed above the borate ion, confirms the general view that pH decreases at the ascending boundary in the positive limb. It seems probable, even in this case, that the dissociation shift results in the conservation of immobile forms of the acid behind the rising boundary.

On the anode side (negative limb) the buffer anions pass the δ boundary and descend into the initial sodium chloride layer, where new equilibria develop. With acetate, the dissociation in the new layer is approximately complete, and with citrate the shift towards full dissociation is considerable. The change is less with phosphate and veronal, whereas there is experimental evidence that the dissociation of the borate ion decreases at the δ boundary in the negative limb.

Although the hydrogen and hydroxyl ions exert a definite influence on the development of the boundary systems, the free ions of these species occur in only low concentrations. The progress of the hydrogen ion is delayed by the reaction with the buffer ions, and only in the most acid of these systems will a significant hydrogen ion gradient enter the cathode solution. Correspondingly, in very alkaline buffers, a hydroxyl ion gradient travels before the descending boundary in the anode solution. In the borate experiment mentioned above, this effect could be demonstrated

as pH and conductivity changes, but a visible boundary was lacking. Such boundaries have often been observed in other systems containing weak electrolytes. However, in the buffer systems of this investigation the most apparent effect of the presence of the hydrogen and hydroxyl ions is probably a slow movement of the δ boundaries, observed in several of the experiments, whereas optically defined boundaries due to the migration of these ions hardly appear. For this reason they have been neglected as independent constituents in the treatment of the systems.

Blurred boundaries. Another similarity between these systems is the fact that no ion constituent of the supernatant is faster than those of the bottom solution. Therefore, when the chloride ion ascends in the positive limb, and when the sodium ion ascends in the negative limb into a lithium solution, we have the case that a following ion is faster than the leading one. WEBER's analysis of this case for a three-ion system shows that the number of boundaries is then indeterminate (11). An algebraic treatment of the electrochemical processes requires the assumption of a definite number of boundaries and is not applicable to this case. But in systems where the critical mobility difference does not give rise to appreciable conductivity changes, the blurring process may be slow, and a moving boundary system will develop, which can be followed for some time. Here the moving boundary equation and the equations derived by DOLE (10) can be applied as long as something is left of the inter-boundary phases. But the discrepancy between the computed and real state increases with time, because the algebraic treatment does not take into account the concentration distribution in the boundary region, and a steady state is never reached.

In all these experiments the blurring process was very fast, but the algebraic solution may nevertheless provide some information about the initial concentration changes. These calculations show that the mobility difference gives rise to an increased concentration of the fast ion in the adjusted solution (compare Tables 1-6). Hence the conductivity is increased below the ascending boundary, and the field strength sufficiently lowered to give the same ion velocity on both sides of the boundary. It is evident from the calculations, that the considerable conductivity gradients at these boundaries will immediately cause blurring.

The equivalent weight distribution. Common is also the fact that the chloride ion, which has a lower equivalent weight than any of the buffer anions, is placed in the bottom phase. The heavy density gradient at the initial boundary is due to the relatively high concentration of the sodium chloride solution. But for this reason the regulating function, $\sum cu$, is much greater below the boundary than above, and it is not surprising if gravitationally unstable layers are developed by the current where the chloride ion ascends in the positive limb and the buffer ion descends in the negative limb.

The computations. A consequence of the great concentration changes within the system is that an assumption of constant relative mobilities of the free ions is in many instances not well justified. This is especially the case when polyvalent ions are present in some of the phases only. It has been mentioned that changes in the state of dissociation of the buffer ions take place in the phase boundaries. As a rule, these equilibrium shifts change the constituent mobilities of the buffer ions. Accurate numerical analyses of these processes would be very difficult to perform, and the treatment is here instead based on evidence from direct pH and conductivity measurements and chemical analyses in these and similar systems. In cases where the simple moving boundary equation can be applied, the mobilities can be corrected for the influence of the medium. This is in general not possible in multi-component systems because these are open to numerical analysis by DOLE's method only (10), and his equations are derived on the assumption of constant relative mobilities. Even when it is possible to use corrected mobilities, the available data are too scanty to allow accurate calculations. It would formally be more adequate to define the constituents of the Tables 1-6 directly by the mobility

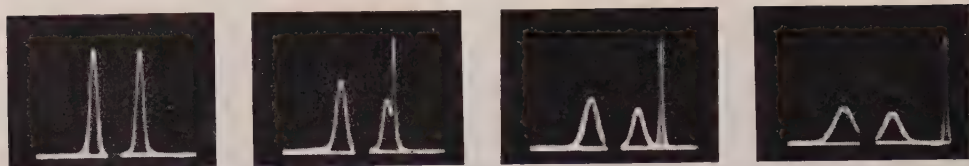


Fig. 1 a. Na^+ , H^+ , Ac^- : Na^+ , Cl^- . Positive limb to the left; negative to the right.

Exposure 1: Before start.

»	2:	After the passage of	36 coulomb.
»	3:	»	» 135 »
»	4:	»	» 317 »

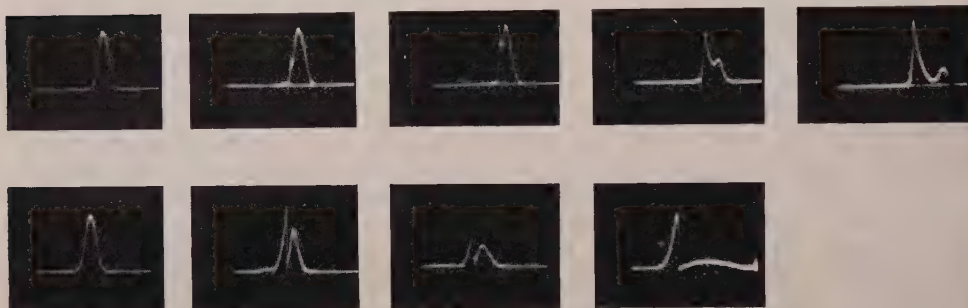


Fig. 2 a. Na^+ , Li^+ , H^+ , F^- , Cl_3^- : Na^+ , Cl^- .

Exposure 1: Before start.

		+ limb	- limb	
»	2:	After the passage of	11	16 coulomb.
»	3:	»	» 18	76 »
»	4:	»	» 188	436 »
»	5:	»	» 400	

used in the computations than to identify them with definite ions. However, the procedure may be allowed because the purpose is mainly a qualitative one, that is, to check the evidence from the optical patterns, especially with regard to the cause of the convection effects.

The relative mobilities have been computed on the assumption that the relative mobility of the sodium ion, r_{Na^+} , equals one. The mobility of this ion (in solutions of monovalent ions at 0°C , $\mu = 0.1$: $u_{\text{Na}^+} = 22.3 \cdot 10^{-5}$; in phosphate buffer, pH 6.81, $\mu = 0.1$: $u_{\text{Na}^+} = 19.6 \cdot 10^{-5}$) as well as those of the chloride ion, the acetate ion, the veronal ion and the lithium ion have been determined by the moving boundary method. For the phosphate ions the determinations of the limiting equivalent conductances by ABBOT and BRAY were used (12). In the other cases the relative mobilities were derived from the conductivities of binary solutions using experimental data or table values (from International Critical Tables, New York and London (1933)).

Comments on the experiments. *Acetate buffer.* Experiments were performed with the two buffer solutions listed above, which differ in pH and ionic strength. The optical patterns were very similar; only one of them is reproduced here (Fig. 1 a.).

In the positive limb the area of the big peak representing the stationary boundary slowly decreased with time. The ascending boundary was completely blurred right from the start. The concentration changes in this limb were visible as a slight elevation of the base line. In the negative limb a sharp and stable acetate-chloride boundary slowly descended into the chloride phase.



Fig. 3 a. Na^+ , H^+ , HPO_4^{2-} : Na^+ , Cl^- . Positive limb to the right, negative to the left.

Exposure 1: Before start
 » 2: After the passage of 42 coulomb.
 » 3: » » » 150 »
 » 4: » » » 264 »

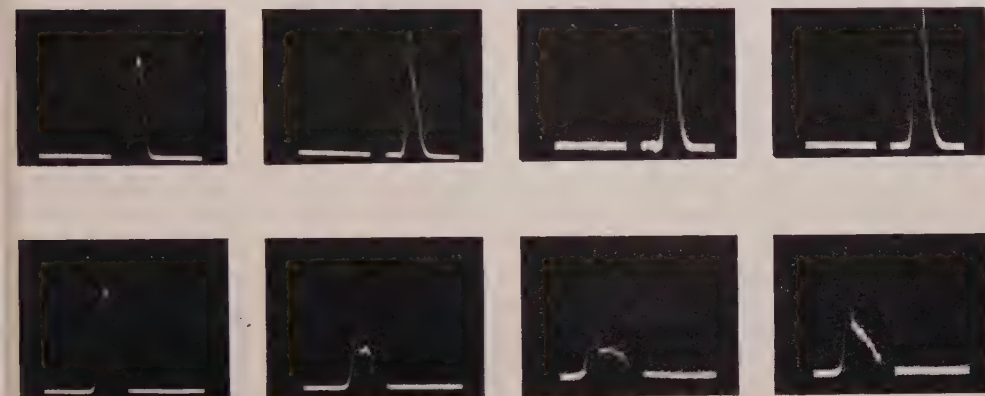
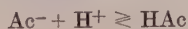


Fig. 4. Na^+ , H^+ , HPO_4^{2-} : Na^+ , Cl^- .

Exposure 1: Before start.
 » 2: After the passage of 38 coulomb.
 » 3: » » » 112 »
 » 4: » » » 176 »

There is evidence that the concentration of free acetic acid remains very nearly constant across a chloride boundary in an acetate solution. On the assumption that the reaction



in the ascending boundary can be neglected, the sodium and chloride concentrations in the adjusted solution are calculated from DOLE's equation (30). The mobility of the free acetate ion is used.

In the negative limb both the acetate ion and the chloride ion disappear in the descending boundary. The concentration of sodium acetate is computed on the assumption that the dissociation of the acetate constituent is complete.

$$r_{\text{Cl}^-} = -1.65, r_{\text{Ac}^-} = -0.75.$$

The computed composition according to Fig. 1 b is given in Table 1. The weight concentrations of the layer 1 and 2⁺ are given in grams per liter 0.4 M acetic acid. The result of the calculations supports the impression of the optical pattern that no unstable layer develops in this system.

1. BRATTSTEN, *The moving boundary systems*

Citrate buffer. In the citrate buffer used here the relative molar concentrations of the three ionic forms are approximately 2:3:1. Although pH is not lower than 4.96, considerable pH gradients may be present in the system.

The optical patterns show that unstable layers develop in both limbs during electrophoresis (Fig. 2 a). A layer in the buffer region of the stationary boundary becomes too heavy in the positive limb. This boundary is gradually destroyed. In the other limb a negative density gradient develops within the stationary boundary. The unstable region is situated in the middle part of the boundary. In exposure 3, convection streamings are seen in the lower part of this boundary. In exposure 4, the peak is nearly obliterated.

The descending lithium ion forms a well defined boundary in the positive limb. In the negative limb, the ascending lithium boundary is visible as a small bump on the baseline in the second and third exposures. No other moving boundaries can be identified, due to the effects of convective mixing and blurring.

An approximate picture of the concentration conditions in this system can be obtained if certain simplifying assumptions are made. First, it is assumed that all citrate-containing phases above the stationary boundaries have the same pH as the top solution. The citrate ion is treated as if only divalent ions were present, and the relative mobility is calculated on this assumption from the conductivity of a disodium citrate solution. Below the stationary boundary in the negative limb the relative proportion of trivalent citrate ions have increased. An r value is calculated from the conductivity of a trisodium citrate solution. In this state the citrate component is faster than the fluoride ion. With these approximations, and neglecting the hydrogen ion, a five-component system with four boundaries in each limb remains to be treated (see Fig. 2 b).

The following relative mobilities have been used:

$$\begin{aligned} r_{\text{Li}^+} &= 0.75 \\ r_{\text{Cl}^{3-}} &= -1.04 \text{ in phase 1, } 2^+, 2^- \\ &\quad \gg -1.24 \gg \gg 3^- \\ r_{\text{F}^-} &= -1.08 \\ r_{\text{Cl}^-} &= -1.65 \end{aligned}$$

DOLE's equation (33) applied to the top solution gives the $V\sigma$ products -1.06 and 0.87 . They define the boundaries 1 and 4 in the positive limb and 3 and 1 in the negative limb. Below the stationary boundary on the negative side, however, the citrate ion is assumed to have the relative mobility -1.24 . A somewhat better value of the $V\sigma$ product is calculated by applying the same equation to the phase 2^- using this r value for the citrate ion. Thus

$$\begin{aligned} V_{1, 2^+} \sigma_{2^+} &= -1.06 & V_{1, 2^-} \sigma_{2^-} &= 0.87 \\ V_{4^+, 5} \sigma_5 &= 0.87 & V_{3^-, 4^-} \sigma_{4^-} &= -1.15 \end{aligned}$$

If the moving boundary equation is applied to successive layers in the system, the concentration distribution of Table 2 is obtained. Recalculated to give the concentration per weight, these figures make it probable that unstable regions develop between the phases 2 and 3 in the positive limb and between the δ boundary and the bottom solution in the negative limb. The instability seems therefore to be satisfactorily explained by the relatively high equivalent weight of the citrate ion.

Phosphate buffer. These experiments were performed with two buffer solutions of the same pH but different ionic strengths. Although the pH gradients at the initial boundaries are only slight, the current splits up the buffer into a more acidic part in the positive limb and a more alkaline part in the negative limb, compared to the original solution.

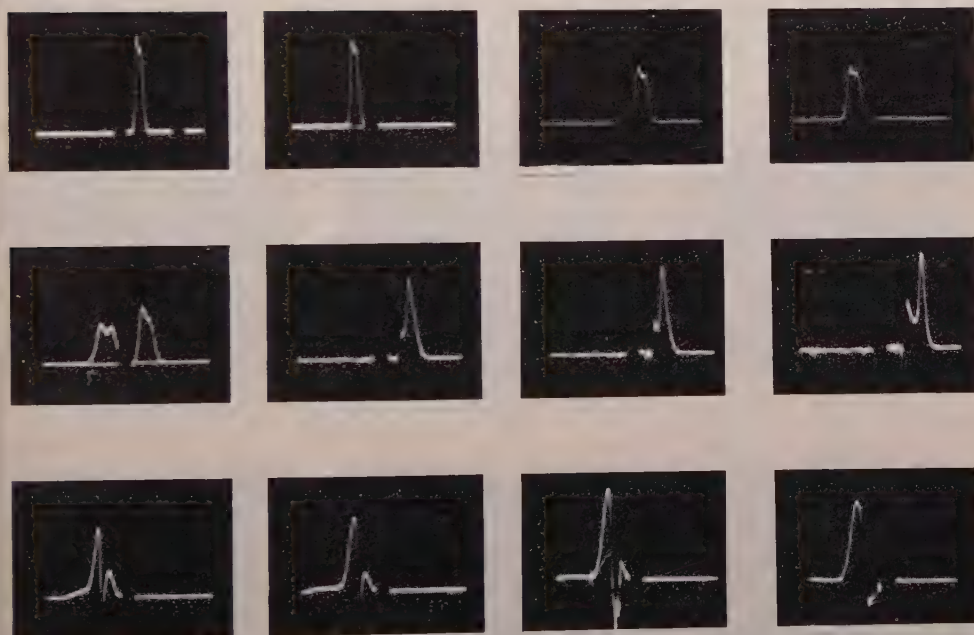

 Fig. 5. Li^+ , H^+ , Cl^- , V^- , $\mu = 0.1$: Na^+ , Cl^- .

Exposure 1: Before start.

» 2: After the passage of 18 coulomb.

» 3: » » » » 132 »

» 4: » » » » 192 »


 Fig. 6 a. Li^+ , H^+ , Cl^- , V^- , $\mu = 0.2$: Na^+ , Cl^- . Top line: Diffusion curves: Second line: Positive limb; Third line: Negative limb.

		+ limb	- limb	
Exposure 1:	After the passage of	0.6	31 coulomb.	
» 2:	» » » »	27	46	»
» 3:	» » » »	38	65	»
» 4:	» » » »	122	122	»

The optical patterns (Fig. 3 a and 4) show that negative density increments are present in both limbs. On the positive side a sharp negative refractive index gradient tends to separate from the upper part of the δ boundary, but still within the boundary region also the density gradient becomes inverted, and convections result. In the negative limb, the stationary boundary undergoes a sharpening. The new phosphate layer is obviously too dense and sinks down into the sodium chloride solution.

The total concentration increment between the top layer and the adjusted sodium chloride phase in the positive limb can be computed by the moving boundary equation. A boundary defined by the relative mobilities of the phosphate ion in the top solution (constituent mobility) and the chloride ion as the two $V\sigma$ products is substituted for the actual transition layer. The concentration of phase 2^+ is found in Table 3. Converted into weight units, figures of the same magnitude are obtained for the phases 1 and 2^+ . Actually a small positive increment is inferred. The hydrogen ion concentration of the lower phase is computed by applying the moving boundary equation to the free ions of this species. Some degree of instability will probably accompany the descending of this ion into the sodium chloride layers, but this is hardly the main source of the instability of the system. It is more probable that too heavy layers develop within the region of the ascending boundary. Fig. 3 c is an approximate account of the ion distribution in this boundary. The concentration of the intermediate layer can be computed on the assumption that each one of the two ionic forms disappear without appreciable net transformation from one form into the other in the two boundaries indicated in Fig. 3 c. The moving boundary equation is thus applied to the sodium and the dihydrogenphosphate ions using the r values -1.11 and -1.65 for the $V\sigma$ products of the faster boundary. The computed concentration of this layer, phase $2'$, is included in Table 3. It gives evidence of a small negative concentration gradient between this phase and 2^+ . The rudimentary sharp boundary observed in the early stages of the experiment is consistent with the view that the greatest negative conductivity gradient is present at the fast boundary, whereas the blurring effect is less pronounced at the slow boundary, where the chloride ion is present on both sides.

For the negative limb, the concentration increment at the stationary boundary is computed on the assumption that pH is about 7 in the new phosphate phase. This layer would be heavier than the bottom solution, according to Table 3.

The following values have been used for the relative mobilities of the ions.

$r_{\text{HPO}_4^{2-}} = -0.87$ in phase 1

» $= -1.11$ » » 1^+ (mobility of the monohydrogen phosphate ion)

» $= -0.66$ » » $2'$ (const. mobility, mobility of the dihydrogen phosphate ion)

» $= -0.95$ » » 2^-

$r_{\text{Cl}^-} = -1.65$

Veronal buffer. Three different buffers were used in these experiments, two of which differed only in ionic strength.

The latter systems gave the optical diagrams of the Figures 5 and 6 a, showing that unstable boundaries developed in both cases. In the positive limb the convection streaming originates from a certain level within the stationary boundary and ascends through the supernatant. In the negative limb, a negative refractive index gradient is present in the stationary boundary. The inverted peak broadens with time. In the first exposures no typical convections are visible. It is therefore probable that the density gradient is initially positive in this zone. But after some time the lower part of the stationary boundary is slowly destroyed, and typical convection streamings enter into the bottom solution.

In the positive limb the lithium-sodium boundary slowly separates from the δ boundary. The peak remains sharp. In the negative limb blurring takes place at the lithium boundary.

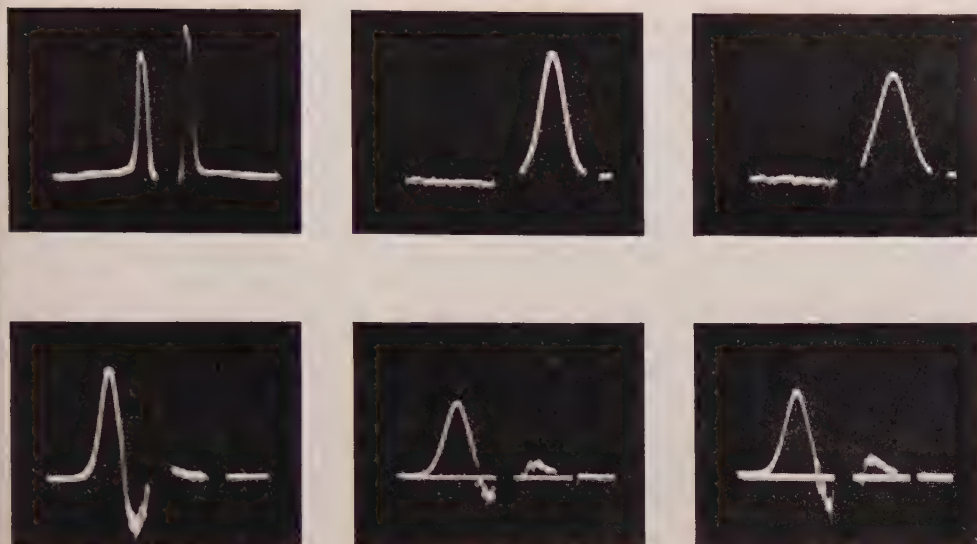


Fig. 7 a. Na^+ , F^- , V^- : Na^+ , Cl^- .

Exposure 1: After the passage of 1 coulomb (+ limb), resp. 31 coulomb (- limb).

» 2: » » » » 58 »
 » 3: » » » » 200 »

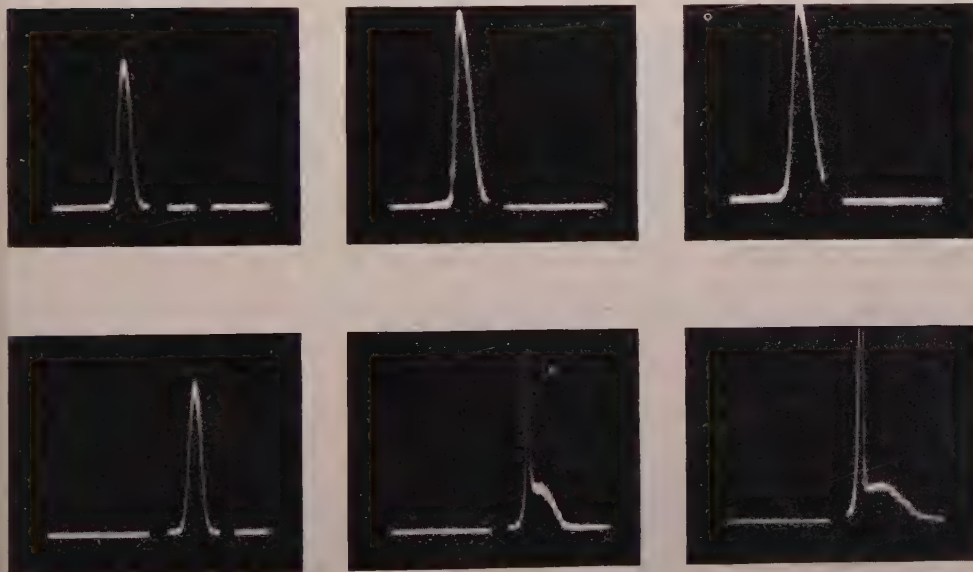


Fig. 8 a. Na^+ , $\text{B}_4\text{O}_7^{2-}$: Na^+ , Cl^- .

Exposure 1: Before start.

» 2: After the passage of 78 coulomb.
 » 3: » » » » 189 »

It can be distinguished to the left in the exposures of the negative limb in Fig. 6 a, but is hardly visible at the lower concentration of Fig. 5.

Evidently, the instability is here also the result of the equivalent weight distribution, especially the position of the heavy veronal ion on top of the chloride ion. This conclusion is further evidenced by the numerical calculations of the salt gradients in the system. The computed concentrations in the case of the more concentrated solution is given in Table 4.

For the positive limb, the assumption was made that the veronal anions are quantitatively replaced by chloride ions, leaving a concentration of veronal in the adjusted solution corresponding to that of the free acid in the buffer of the top phase. The dissociation of veronal in phase 2^+ is neglected, and the mobility of the free anion is used in the calculations.

In computing the composition of the new phases in the negative limb, a mobility of the veronal ion corresponding to 91% dissociation is used. The composition of phase 2^- is easily obtained by the moving boundary equation. The composition of phase 3^- is obtained similarly, after one $V\sigma$ value for the descending boundary is computed from the data of phase 2^- . Although the influence of the pH change at the stationary boundary is neglected, the computed concentration changes are in qualitative agreement with the optically observed density conditions (Table 4).

The following values for the relative mobilities were used:

$$\begin{aligned} r_{\text{Li}^+} &= 0.75 \\ r_{\text{V}^-} &= -0.43 \text{ in phase } 1^+ \\ &= -0.39 \quad \text{»} \quad 1^-, 2^- \text{ and } 3^- \\ r_{\text{Cl}^-} &= -1.65 \end{aligned}$$

A peculiar effect was observed in these systems, which is probably due to the high specific refractive index and the slow diffusion of the veronal ion relative to the other ions present. The exposures of Fig. 6 a, the first line, were taken within an hour before the current was applied. A decrease in the refractive index of the solution in the central part of the boundary is visible, which is due to free diffusion only.

With the third veronal buffer the boundary system of Fig. 7 a developed. The optical patterns show the same characteristics as those of Fig. 5 and 6 a. Convection streamings are present above the δ boundary in the positive limb and below this boundary in the negative limb.

This buffer did not contain surplus veronal, hence the pH was relatively high. In these three experiments with veronal the migration of the δ boundary was striking, but due to the convection effects below the boundary, it seems uncertain whether the displacement is to be ascribed to differences in the transport numbers of the ions in adjacent phases. Such effects were neglected in the numerical calculation of the ion distribution. This was performed according to Fig. 7 b, using the regulating functions of the two end phases.

$$\begin{aligned} r_{\text{V}^-} &= -0.43 \\ r_{\text{F}^-} &= -1.08 \\ r_{\text{Cl}^-} &= -1.65 \end{aligned}$$

The distribution of the weight concentration in Table 5 shows, in agreement with the experimental finding, that negative density gradients develop at the boundaries where veronal disappears in both the positive and the negative limbs, thus once more an evidence of the unsuitable equivalent weight distribution in these systems. In particular the effect of the light fluoride ion in decreasing the density of the phase 3^- is striking.

Borate buffer. Finally, the moving boundary system between a disodium borate solution and 1 M sodium chloride was analysed.

During the electrophoresis convection streamings appeared above the stationary boundary in the positive limb and below the corresponding boundary in the negative limb, Fig. 8 a. There is an apparent similarity between this pattern and those of the phosphate systems (Fig. 3 a and 4). In both cases the δ boundary undergoes sharpening by the current. In the borate system, however, no trace of the ascending boundary was visible in the positive limb.

Analysis after the end of the experiment showed the presence of borate ions in the vicinity of the stationary boundary in the positive limb, but it is impossible to decide from this whether the borate ion is present in this layer as a result of the electrochemical reaction only, or if it is brought there by convection transport. The pH changes are not negligible in this system. In the experiment referred to previously, where a disodium borate solution of the ionic strength 0.2 and pH 10 was placed below a sodium chloride solution, pH was approximately 10 above the rising boundary in the positive limb and about 9 in the borate solution below this boundary. In the negative limb pH was 8.6 in the new sodium chloride layer below the stationary boundary. Unfortunately, sufficient data are not available to allow for these effects. Table 6 contains the result of an estimation of the concentration distribution according to Fig. 8 b, where the pH influence is neglected. A mobility for the borate ion is computed from the conductivity of a disodium borate solution assuming only divalent borate ions.

$$\begin{aligned} r_{\text{B}_4\text{O}_7^{2-}} &= -0.79 \\ r_{\text{Cl}^-} &= -1.65 \end{aligned}$$

The result of this calculation is in agreement with the experimental findings that unstable regions develop above the stationary boundary in the positive limb and below the same boundary in the negative limb.

Results and discussion

The experiments show that gravitationally unstable layers develop in these systems, except when the top phase is an acetate buffer. The computations of the ion distribution make it probable that the instability is due to the fact that the chloride ion is too light compared to the buffer ions. The density gradient is inverted in the cathode compartment where the chloride ion replaces the buffer anion in a rising boundary, and in the anode compartment where the buffer ion follows the chloride ion behind the descending boundary.

A comparison of the equivalent weights of the anions in these systems gives the following sequence:

	Cl^-	Ac^-	H_2PO_4^-	$\frac{1}{2} \text{HPO}_4^{2-}$	$\frac{1}{2} \text{B}_4\text{O}_7^{2-}$	$\frac{1}{2} \text{HCl}^{2-}$	V^-
Equiv. weight . .	35.5	59.0	97.0	48.0	77.6	96.1	183.2
$-r$	1.65	0.75	0.66	1.11	0.79	1.04	0.43

In the second line the relative mobilities have been added. (It should once more be pointed out that these figures are not strictly accurate. They are used here to indicate the relative order of magnitude of the mobilities only.) All the buffer anions are slower than the chloride ion, and to a certain extent this circumstance causes a balancing of the inequality of the equivalent weights in that the concentration of an adjusted solution is lower the faster the leading ion and the slower the following one. Due to this relationship between the mobility and the concentration, the

Table 1

Acetate buffer.

δ	$\begin{array}{c} \text{Na}^+ \quad + \quad \text{Ac}^- \\ \text{H}^+ \\ 1 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{Na}^+ \quad - \quad \text{Ac}^- \\ \text{H}^+ \\ 1 \end{array}$	δ
	$\begin{array}{c} \text{Na}^+ \quad \text{Ac}^- \\ \text{H}^+ \quad \text{Cl}^- \\ 2^+ \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{Na}^+ \quad \text{Ac}^- \\ 2^- \end{array}$	
	$\begin{array}{c} 3 \\ \text{Na}^+ \quad \text{Cl}^- \end{array}$	$\begin{array}{c} 3 \\ \text{Na}^+ \quad \text{Cl}^- \end{array}$	

Phase	Positive limb		Negative limb	
	Concentration		Concentration	
	equiva- lents $\cdot 10^3/l$	g/l	equiva- lents $\cdot 10^3/l$	g/l
1	$\text{Na}^+ = 100$ $\text{Ac}^- = -100$ $\text{HAc} = 400$	16.5	$\text{Na}^+ = 100$ $\text{Ac}^- = -100$ $\text{HAc} = 400$	16.5
2	$\text{Na}^+ = 226$ $\text{Cl}^- = -226$ $\text{HAc} = 400$	22	$\text{Na}^+ = 690$ $\text{Ac}^- = -690$	57
3	$\text{Na}^+ = 1000$ $\text{Cl}^- = -1000$	58.4	$\text{Na}^+ = 1000$ $\text{Cl}^- = -1000$	58.4

Fig. 1 b.

Table 2

Citrate buffer.

δ	$\begin{array}{c} \text{Na}^+ \quad + \quad \text{F}^- \\ \text{Li}^+ \quad \text{Ci}^{3-} \\ \text{H}^+ \\ 1 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{Na}^+ \quad - \quad \text{F}^- \\ \text{Li}^+ \quad \text{Ci}^{3-} \\ \text{H}^+ \\ 1 \end{array}$	δ
	$\begin{array}{c} \text{Na}^+ \quad \text{Ci}^{3-} \\ \text{Li}^+ \quad \text{Cl}^- \\ 2^+ \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{Na}^+ \quad \text{F}^- \\ \text{H}^+ \quad 2^- \quad \text{Ci}^{3-} \end{array}$	
	$\begin{array}{c} \text{Na}^+ \quad \text{Cl}^- \\ \text{Li}^+ \\ 3^+ \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{Na}^+ \quad \text{F}^- \\ 3^- \quad \text{Ci}^{3-} \end{array}$	
	$\begin{array}{c} 4^+ \\ \text{Na}^+ \quad \text{Cl}^- \\ \text{Li}^+ \end{array}$	$\begin{array}{c} 4^- \\ \text{Na}^+ \quad \text{Ci}^{3-} \end{array}$	
	$\begin{array}{c} 5 \\ \text{Na}^+ \quad \text{Cl}^- \end{array}$	$\begin{array}{c} 5 \\ \text{Na}^+ \quad \text{Cl}^- \end{array}$	

Fig. 2 b.

Phase	Positive limb		Negative limb	
	Concentration		Concentration	
	equiva- lents $\cdot 10^3/l$	g/l	equiva- lents $\cdot 10^3/l$	g/l
1	$\text{Na}^+ = 100$ $\text{Li}^+ = 100$ $\text{F}^- = -100$ $\text{HCl}^{2-} = -100$	14.4	$\text{Na}^+ = 100$ $\text{Li}^+ = 100$ $\text{F}^- = -100$ $\text{HCl}^{2-} = -100$	14.4
2	$\text{Na}^+ = 119$ $\text{Li}^+ = 117$ $\text{Cl}^- = -134$ $\text{HCl}^{2-} = -103$	18	$\text{Na}^+ = 220$ $\text{F}^- = -110$ $\text{HCl}^{2-} = -110$	18
3	$\text{Na}^+ = 120$ $\text{Li}^+ = 118$ $\text{Cl}^- = -238$	12	$\text{Na}^+ = 866$ $\text{F}^- = -382$ $\text{Ci}^{3-} = -484$	60
4	$\text{Na}^+ = 448$ $\text{Li}^+ = 457$ $\text{Cl}^- = -905$	34	$\text{Na}^+ = 896$ $\text{Ci}^{3-} = -896$	77
5	$\text{Na}^+ = 1000$ $\text{Cl}^- = -1000$	58.4	$\text{Na}^+ = 1000$ $\text{Cl}^- = -1000$	58.4

Table 3

Phosphate buffer.

Phase	Positive limb		Negative limb	
	Concentration		Concentration	
	equiva- lents · 10 ³ /l	g/l	equiva- lents · 10 ³ /l	g/l
1	Na ⁺ = 75 H ⁺ = 25 HPO ₄ ²⁻ = -100	5.0	Na ⁺ = 75 H ⁺ = 25 HPO ₄ ²⁻ = -100	5.0
2'	Na ⁺ = 88 H ⁺ = 17 HPO ₄ ²⁻ = -17 Cl ⁻ = -71	6.2		
2	Na ⁺ = 100 H ⁺ = 1 Cl ⁻ = -100	5.8	Na ⁺ = 783 H ⁺ = 299 HPO ₄ ²⁻ = -1082	68
3	Na ⁺ = 1000 Cl ⁻ = -1000	58.4	Na ⁺ = 1000 Cl ⁻ = -1000	58.4

Fig. 3 b.

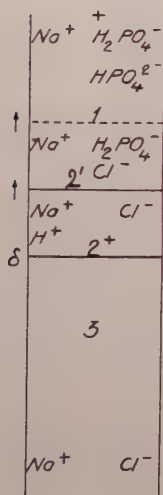


Fig. 3 c.

Table 4

Veronal buffer.

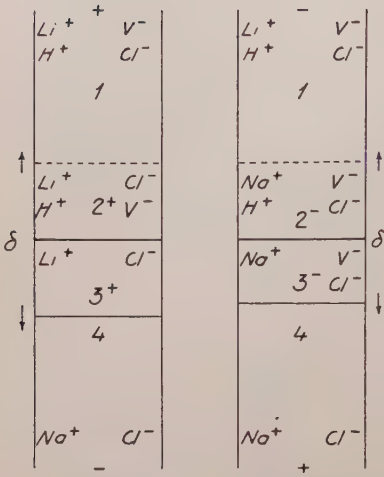


Fig. 6 b.

Phase	Positive limb		Negative limb	
	Concentration		Concentration	
	equiva- lents · 10 ³ /l	g/l	equiva- lents · 10 ³ /l	g/l
1	Li ⁺ = 200 H ⁺ = 10 Cl ⁻ = -100 V ⁻ = -110	25.1	Li ⁺ = 200 H ⁺ = 10 Cl ⁻ = -100 V ⁻ = -110	25.1
2	Li ⁺ = 289 Cl ⁻ = -289 HV = 10	14	Na ⁺ = 231 H ⁺ = 10 Cl ⁻ = -121 V ⁻ = -120	31
3	Li ⁺ = 830 Cl ⁻ = -830	35	Na ⁺ = 661 H ⁺ = 31 Cl ⁻ = -347 V ⁻ = -345	91
4	Na ⁺ = 1000 Cl ⁻ = -1000	58.4	Na ⁺ = 1000 Cl ⁻ = -1000	58.4

Table 5

Veronal buffer.

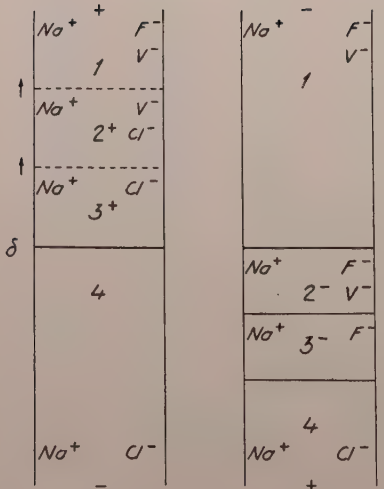


Fig. 7 b.

Phase	Positive limb		Negative limb	
	Concentration		Concentration	
	equiva- lents · 10 ³ /l	g/l	equiva- lents · 10 ³ /l	g/l
1	Na ⁺ = 200 F ⁻ = -100 V ⁻ = -100	24.8	Na ⁺ = 200 F ⁻ = -100 V ⁻ = -100	24.8
2	Na ⁺ = 238 V ⁻ = -81.9 Cl ⁻ = -156	25	Na ⁺ = 617 V ⁻ = -305 F ⁻ = -312	76
3	Na ⁺ = 326 Cl ⁻ = -326	19	Na ⁺ = 840 F ⁻ = -840	35
4	Na ⁺ = 1000 Cl ⁻ = -1000	58.4	Na ⁺ = 1000 Cl ⁻ = -1000	58.4

Table 6
 Borate buffer.

Phase	Positive limb		Negative limb	
	Concentration		Concentration	
	equiva- lents · 10 ³ /l	g/l	equiva- lents · 10 ³ /l	g/l
1	Na ⁺ = 134 B ₄ O ₇ ²⁻ = -134	13.4	Na ⁺ = 134 B ₄ O ₇ ²⁻ = -134	13.4
2	Na ⁺ = 188 Cl ⁻ = -188	11	Na ⁺ = 714 B ₄ O ₇ ²⁻ = -714	72
3	Na ⁺ = 1000 Cl ⁻ = -1000	58.4	Na ⁺ = 1000 Cl ⁻ = -1000	58.4

Fig. 8 b.

monovalent phosphate ion would give a stable descending boundary in the anode vessel, whereas the divalent phosphate ion would not, in spite of the lower equivalent weight of this ionic form.

It can be concluded by analogy that the conditions will be reversed if the system, although stable with regard to the anions, contains too slow and heavy cations, for instance certain organic compounds often used as buffer substances in the neutral range. In such cases convection streamings will ascend in the anode compartment and descend in the cathode compartment.

With some of the buffer systems (acetate, phosphate, and veronal) duplicate experiments were performed using different total concentration of the upper phase. The characteristics of the optical patterns changed very little, although there is a slight evidence of improved stability in the dilute solutions. As the convection effect was not completely eliminated, however, there is no advantage in using low concentrations for the reason of increased stability, because the electrical velocities of ions rapidly increase with dilution.

In all experiments the electric current was of the same order of magnitude as that used in practice with these buffer systems. Since the cross-section areas of the electrode vessels are about twenty times that of the *U*-tube, the reactions studied took place at a much higher current density than is generally the case. On the other hand, the cooling of the *U*-tube is much more efficient than that of the electrode vessels. It is impossible to state accurately how these circumstances influence the course of the reactions. Very probably, however, they do not cause principally significant changes.

The blurring effect is in both electrode vessels directed towards the centre of the system, that is, the separation zone. As a consequence of the greater mobility difference between the chloride and the buffer ions than between the sodium and the lithium ions the effect is much more pronounced in the former case than in the latter. In accordance, the lithium-sodium boundary is never completely lacking in the optical patterns, whereas there is no indication of a distinct ascending boundary between the chloride and the buffer phases.

With regard to the problem of keeping the electrode reagents outside the separation zone, the conditions derived from the present experiments can easily be generalized. The volume displacement of these ions is smallest when the transport takes place at sharp moving boundaries. In this case the free diffusion is balanced by the electric current. A relatively greater volume is needed between the electrode and the separation zone when the blurring condition prevails, but the transport of ions is still governed by the electric migration, in this case co-operative with the process of free diffusion. With convection effects present, however, entirely new and irregular conditions may develop. In the systems investigated here, the processes in the cathode compartment are much more dangerous than those at the anode. In the former case both the electric migration at blurred boundaries and the convection transport of the anions are directed towards the central part of the system, whereas in the latter case an ascending boundary can generally be avoided, and the convection is restricted to the solution below the initial phase boundary. With both the blurring and the convection effects present, it is obviously the latter which is determining factor for the size and shape of the electrode compartment. The advantage of building this chamber according to the principle of a labyrinth has been realized by many workers. Another efficient means of limiting the convection transport of ions is to introduce a continuous liquid flow of buffer solution between the separation zone and the electrodes, although this is of course not possible in HITTORF's method. The convection transport is altogether eliminated, however, when a mechanical support is present which neutralizes the gravity effect on negative density increments. In the latter case the blurring factor is decisive of the volume capacity of the electrode tubes.

In an analytical experiment the electrical displacement of ions in a blurred boundary is not appreciable. For instance, with an acetate buffer, 500 coulombs will cause an electrical displacement of the chloride ions in the cathode compartment of the magnitude of 50 ml. In preparative electrophoresis much greater quantities of electricity are used, hence much greater displacements of the ions of the electrode reagent must be accounted for. In this case the introduction of a liquid commutator for changing the polarity of the electrodes without reversing the current through the separation zone provides an efficient means of combining a high separation capacity with a small size of both the electrodes and the electrode chambers. This device was used by SVENSSON in preparative moving boundary electrophoresis (9). With inert electrodes the hydrogen and hydroxyl ions are produced and migrate under such conditions that they are following ions at the boundaries of the buffer phase, that is, the condition of blurring. The volume displacements of these ions are therefore much more important than those of the ions of reversible electrodes. In the continuous flow modification of zone electrophoresis, where convection is eliminated by the presence of the capillary system, the volume displacements of the hydrogen and hydroxyl ions amount to 0.5–1.5 l. per hour (13). In this method the control of the electrode reactions affords a real problem, in spite of the fact that the main obstacle, the convection transport, is absent.

In addition, the possibility of slowing down the velocities of ions by the insertion of a zone of concentrated buffer solution next to the electrode liquid can always be applied, although this arrangement alone is not satisfactory when ascending convection transport is present. It may be pointed out that in order to keep the concentrated layer stationary in the electrode vessel, the transference numbers of the ions should be the same in this solution as in the dilute buffer.

The arrangements introduced to limit the transport of the electrode reagents must simultaneously conform to the condition of rate control and constancy of the liquid movement in the apparatus. This is an easy problem if only a moderate accuracy is sufficient, but in precise measurements the conditions become more restrictive. To avoid errors due to slight temperature shifts, the volume between the electrodes and the separation zone in the moving boundary methods should be as small as possible. The advantage of keeping one side of the apparatus closed implies the use of a reversible electrode. For proper functioning, a silver-silver halide electrode must be bathed in a free solution of the halide salt, where diffusion and convection transport are not inhibited. These facts suggest that the most appropriate conditions would be to use a system that would develop only descending, stable boundaries at one electrode, and to close this side of the apparatus. Of the systems investigated here, this condition can be realized only with the acetate buffer, keeping the anode side of the apparatus closed. In protein analysis those ions are especially suitable which have low mobilities. This is generally the case with the complex buffer ions, but with regard to the stability of the boundary systems in the electrode vessels, the relatively high equivalent weight of these ions is a drawback. The lithium and fluoride ions are electrically slow and have low molecular weights. Increased stability of the moving boundary systems in the electrode compartments could be obtained with a silver-silver bromide electrode using a lithium bromide or a sodium bromide solution instead of sodium chloride as the electrode liquid and bottom phase. A coarse estimation shows that even a descending veronal boundary would in this case be gravitationally stable. However, the addition of light ions such as fluoride to the buffer phase would give rise to convection and should be avoided (compare the veronal experiment with fluoride ions present, Fig. 7 and Table 5).

With this type of boundary system and precaution taken that pH gradients do not interfere, the movement associated with the changes in the liquid phases can be calculated with accuracy. The halide phase, the concentration of which decreases during the experiment, can be regarded as uniform due to the action of free convection. The volume and concentration of the descending buffer phase at each stage can be computed from the mobilities of the buffer ions and the mobilities and concentrations of the ions in the bottom phase. Although of low absolute magnitude, the volume correction due to the electrode reaction during electrophoresis is of course the more significant the lower the mobility of the ion under investigation. In transference determinations of the slow protein ions it is therefore generally worth while choosing such experimental conditions that this factor is known with some degree of accuracy.

SUMMARY

The reactions occurring in the electrode tubes in protein analysis by the moving boundary method have been reproduced in the *U*-tube and studied optically. The moving boundary systems developing between acetate, citrate, phosphate, veronal, and borate buffers and 1 M sodium chloride were analysed. The optical patterns show, in comparison with numerical estimations of the concentration distribution, that the acetate system is gravitationally stable, whereas in the other systems gravitationally unstable layers develop in the cathode compartment where the chloride ion ascends into the buffer phase, and in the anode compartment where

the buffer anion descends into the chloride phase. The convection effect is explained by the original equivalent weight distribution in the two phases. In the ascending boundaries blurring takes place immediately when the chloride ion follows a slower buffer anion and in cases where the sodium ion follows the lithium ion. The magnitude and importance of these effects with regard to different types of electrophoretic systems is discussed. In analytical moving boundary methods a reversible type of electrode giving only descending, stable boundaries at one pole seems to be most suitable, for instance a silver-silver bromide electrode in sodium bromide or lithium bromide solution below a buffer solution containing either of these cations.

Acknowledgements

The author is indebted to Professor ARNE TISELIUS for supporting this investigation and for revision of the manuscript.

I also wish to thank my fellow-workers at this Institute for discussions of the manuscript, in particular Dr I. GORDON FELS, who revised the text linguistically.

The work was financially supported by the Swedish Natural Science Research Council.

Institute of Biochemistry, University of Uppsala, Uppsala, Sweden.

REFERENCES. 1. Prausnitz, P. H. and Reitstötter, J. *Elektrophorese, Elektroosmose, Elektrodialyse in Flüssigkeiten*. Dresden and Leipzig. (1931) 8. — 2. Abramson, H. A., Moyer, L. S. and Gorin, M. H. *Electrophoresis of proteins*, New York (1942), 43. — 3. Svensson, H. *Advances in Protein Chemistry* 4 (1948), 251. — 4. Lewis, G. N. *J. Am. Chem. Soc.* 32 (1910) 862. — 5. Longworth, L. G. *J. Am. Chem. Soc.* 65 (1943) 1755. — 6. Longworth, L. G. *J. Am. Chem. Soc.* 69 (1947) 1288. — 7. Tiselius, A. *Svensk Kem. Tidskr.* 50 (1938) 58. — 8. Tiselius, A. *Trans. Faraday Soc.* 33 (1937) 524. — 9. Svensson, H. *Arkiv Kemi Mineral. Geol.* 22A (1946) No. 10. — 10. Dole, V. P. *J. Am. Chem. Soc.* 67 (1945) 1119. — 11. Weber, H. *Sitzungsber. Akad. Wissensch. Berlin* (1897) 936. — 12. Abbot, G. A. and Bray, W. C. *J. Am. Chem. Soc.* 31 (1909) 729. — 13. Svensson, H. and Brattsten, I. *Arkiv Kemi* 1 (1949) 401.

Tryckt den 22 april 1952

Uppsala 1952. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

Stability of cobra venom acetylcholinesterase and the stabilizing effect of various metallic ions

By KLAS-BERTIL AUGUSTINSSON and MARGARETA GRAHN

With 4 figures in the text

Cobra venom has a high cholinesterase activity, first noted by IYENGAR, SEHRA, MUKERJI and CHOPRA (1). This esterase is to be regarded as a typical acetylcholinesterase or acetochoinesterase (2-6). The hydrolysis of choline and non-choline esters by cobra venom is attributed to this esterase alone (5, 6).

Dried cobra venom is a most suitable source of acetylcholinesterase. It retains high enzyme activity for years, it is easy to use, and it is up to the present the only known cholinesterase preparation available in dry form. The stability of the solutions, however, varies greatly from medium to medium. In some instances, fresh solutions behave differently from old ones regarding the course of hydrolysis (5). Moreover, the enzyme is inactivated at interfaces by oily substances in a non-specific way, irrespective of whether they are potential substrates or not (6).

It has been found that the esterase is stable for months in a bicarbonate RINGER's solution when kept in the refrigerator. In the absence of metallic ions, however, the activity decreases rapidly. The main purpose of the present work was to study the influence of various metallic ions on the stability of cobra venom acetylcholinesterase and to find a suitable medium for making stock solutions of the enzyme. Although the effect of ions on cholinesterases has been studied previously with various materials (7), experiments of the kind described in the present communication have not been published.

Methods and material

Measurement of enzyme activity. The WARBURG manometric technique was used to measure rates of hydrolysis (8). All measurements were made at 25° C. The esterase activity is expressed in b_{30} values, i.e., the amount of CO₂ in μ l evolved from a bicarbonate solution during 30 minutes minus the corresponding value for non-enzymic hydrolysis.

Enzyme and substrate. A dried and crystallised preparation of cobra venom (*Naja naja*) was employed as enzyme source. It was dissolved in distilled water, unless otherwise stated. These solutions were dialysed in collodion membranes in certain experiments. In the studies on the influence of various metallic ions on enzyme stability, the enzyme was made up by dissolving dried venom in a water solution of metallic salts of various concentrations, or a dialysed enzyme solution was diluted with solutions of the salt to give a certain concentration of the latter. The enzyme solutions were kept at 25° C, unless otherwise stated.

Acetylcholine chloride was used as substrate in all experiments.

Results

Stability of enzyme activity in RINGER's solution. Cobra venom acetylcholinesterase is very stable in a bicarbonate RINGER's solution when kept in the refrigerator (4.5°C); only a few per cent reduction of activity is found during a period of 70 days (Fig. 1). Such a solution has been used in experiments, the results of which have been published recently (5). The composition of the RINGER's solution is the following: 0.12 M NaCl , 0.034 M NaHCO_3 , 0.0013 M MgCl_2 .

Stability of enzyme activity in water solutions. Water solutions of the enzyme deteriorate rapidly even at 4.5°C . If the solutions are kept at higher temperatures the esterase activity is reduced still more rapidly. This is demonstrated in Fig. 1. At 25°C the reduction is 50 % in about an hour, after 10 hours the activity is only 10 % of the original activity. Due to this rapid decline the original esterase activity of a water solution can be estimated approximately only by extrapolation.

Decrease of enzyme activity by dialysis. The activity of water solutions decreases rapidly by dialysis, illustrated in Fig. 3. The solution was dialysed against distilled water at 4.5°C in a collodion membrane and the water outside the bag changed three times during a 25 hour period. After that period the enzyme solution is practically inactive.

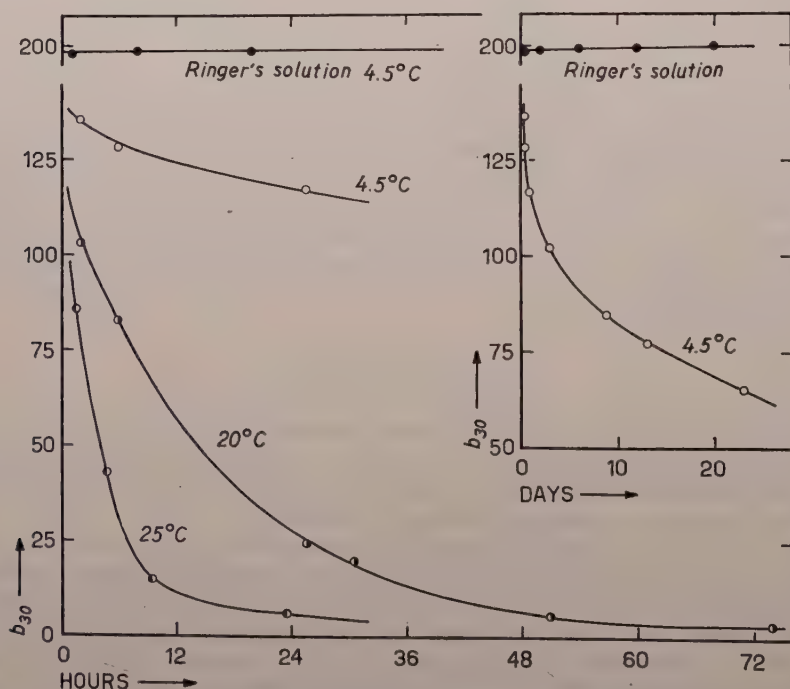


Fig. 1. Stability of acetylcholinesterase activity in water solutions of cobra venom, 25 mg venom per 100 ml water.

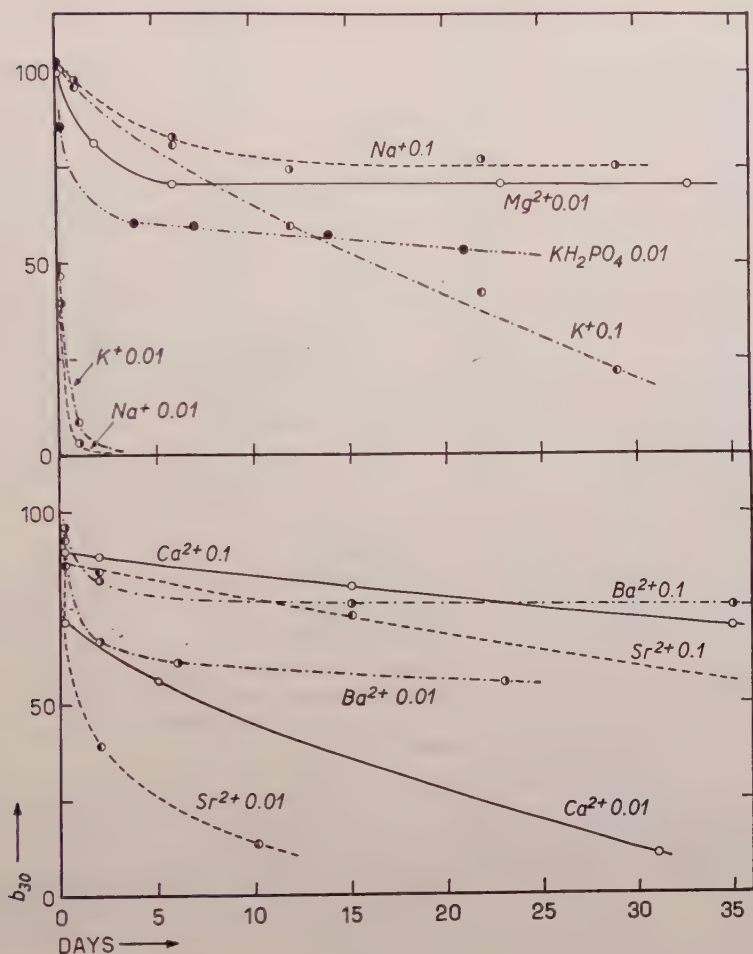


Fig. 2. Effect of metallic ions on the stability of cobra venom acetylcholinesterase at 25° C. The venom is dissolved in water and the solution dialysed for 90 minutes against distilled water before the addition of the metallic chlorides. Numbers refer to molarity.

It has been demonstrated previously (9) with solutions of electric organ esterase that the enzyme which is inactivated by dialysis, may be reactivated by adding the dialysate. The cobra venom solution behaves differently. Thus, the addition of the dialysate to an inactivated enzyme solution does not give reactivation, demonstrated in Table 1. Little or no activity is found in the dialysate.

Effect of metallic ions on the stability of enzyme activity. In order to find out how various metallic ions influence the stability of acetylcholinesterase activity, water solutions of cobra venom were dialysed at 25° C for about 90 minutes against distilled water. This process reduces the activity of the original enzyme solution to about 60 %. The dialysed solutions were incubated for various lengths of time with salt

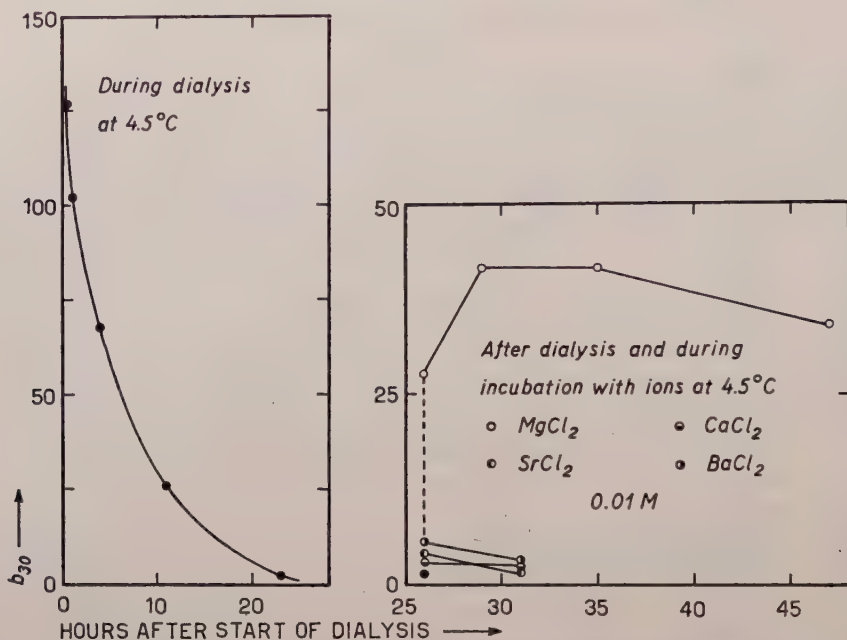


Fig. 3. Decrease of enzyme activity by dialysis and enzyme reactivation by various metallic ions. Dialysis is stopped after 26 hours when the enzyme solution is treated with salt solutions. Molar concentration of ions in the incubation mixtures 0.01 *M*.

solutions of two different concentrations, 0.01 and 0.1 *M* respectively, and kept at 25° C. The activities of the enzyme solutions thus treated were tested during a period of 30–35 days. The results are recorded in Fig. 2.

As demonstrated above in Fig. 1, a salt-free enzyme solution loses its activity rapidly at 25° C. In the presence of 0.01 *M* sodium or potassium chloride the enzyme

Table 1

Inactivation of acetylcholinesterase of cobra venom solutions by dialysis. For each type of solution the results from two sets of experiments are given.

Activity before dialysis	Equal volumes of	Cobra venom in H ₂ O		Cobra venom in RINGER's solution	
	enzyme and H ₂ O	105	108.5	156	152
After 25 hours' dialysis	enzyme and H ₂ O	21	30	79.5	85.5
	enzyme and dialysate	21.5	28.5	71	79
	dialysate and H ₂ O	—	—	12	—

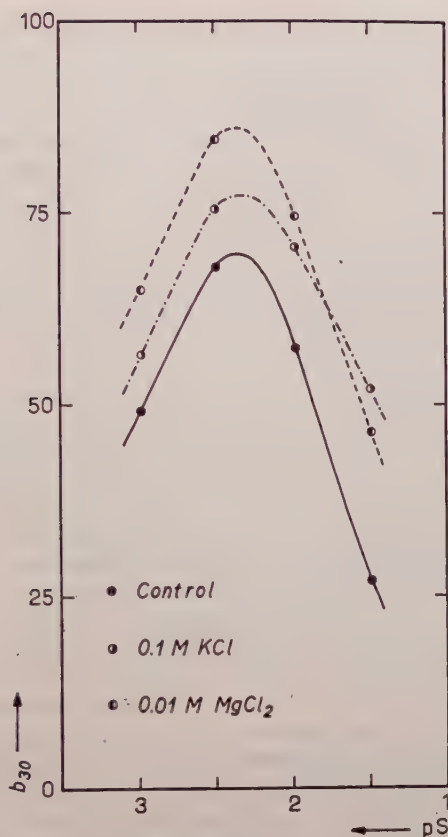


Fig. 4. Effect of potassium and magnesium ions respectively on the activity-pS relationship of cobra venom acetylcholinesterase. In each experiment the reaction mixture (2.00 ml) contains 0.1 mg venom and 0.034 *M* NaHCO₃.

stability is as low as in the absence of any salt. Higher concentrations (0.1 *M*) of either of these metallic ions definitely render greater stability. On the other hand, in the presence of potassium phosphate, KH₂PO₄, of comparatively low concentration the enzyme is fairly stable. The stabilizing effects of various anions will be reported in due course.

In the presence of the chlorides of strontium, calcium, barium, and magnesium respectively the enzyme is much more stable than in the presence of the monovalent alkaline metals (Fig. 2). Magnesium ion was by far the best stabilizing ion tested. Among the four ions mentioned strontium is least active. Mg²⁺ is more active than Ba²⁺ which in its turn is more active than Ca²⁺.

In most experiments the effect of an ion seems to require an incubation period of about 5 days. For example, when magnesium chloride is added to a concentration of 0.01 *M*, the enzyme activity is gradually decreased during the first days. After this period the activity is altered very little during a month or more. Barium chloride

gives similar results, but great stabilizing effect is obtained only if the salt concentration is higher than 0.01 *M*.

It is concluded that magnesium is a definite stabilizer of the acetylcholinesterase of cobra venom and it was expected that this metallic ion also is an enzyme activator. The effect of magnesium, however, seems not to be an immediate one. If an enzyme solution is inactivated almost completely by dialysis, magnesium ions reactivated to a certain extent. A much smaller effect has been obtained with the other divalent ions. Fig. 3 illustrates the results obtained with an enzyme solution inactivated by dialysis and reactivated by incubation with various metallic chlorides at 4.5° C. The enzyme activity gradually increases during the first hours after the addition of magnesium chloride. These results are to be regarded as preliminary only, for the conditions of reactivation used may not be the best ones in respect of temperature, pH, and so on.

Many years ago DELEZENNE (10) found that snake venoms contain zinc, especially the venoms from Colubridae. Preliminary experiments have shown that zinc chloride (0.01 *M*) has no influence on neither the stability nor activity of cobra venom acetylcholinesterase.

Effect of ions on activity-substrate concentration relationship (activity-pS curves). The cobra venom acetylcholinesterase gives a bell-shaped curve when activity is plotted against pS, *i.e.*, the negative logarithm of molar substrate concentration (4). The effect of potassium chloride on this relationship for cholinesterases of other sources has been discussed previously. According to MENDEL and RUDNEY (11), KCl causes a shift of the optimum esterase activity to lower pS values; this could not be confirmed by AUGUSTINSSON (8). Both groups of workers employed similar preparations of acetylcholinesterase and the concentration of bicarbonate in the reaction mixture was the same. It has also been suggested (12) that magnesium chloride would give the same effect as potassium chloride in MENDEL's experiment.

The effect of potassium and magnesium ions respectively on the activity-pS relationship of cobra venom acetylcholinesterase is demonstrated in Fig. 4. Neither of these ions cause any shift of pS_{opt} ; for potassium chloride this confirms the previous observation of the present author with cholinesterases of other sources. A slight increase of activity was obtained with 0.1 *M* KCl. The activation by 0.01 *M* $MgCl_2$, demonstrated above, is also shown in Fig. 4. In the control experiment sodium bicarbonate was the only metallic salt present in the reaction mixture.

Discussion

Most cholinesterases studied previously have been shown to be inactivated by dialysis and then reactivated by adding the dialysate or certain bivalent ions (7). It is demonstrated in the present paper that the acetylcholinesterase of cobra venom behaves differently as regards reactivation after dialysis. It may be that the conditions for this reactivation have been unfavorable.

It is clear, however, from the results reported here that magnesium ions stabilize the esterase in solution and activate the esterase activity. Barium and calcium ions also are good stabilizers; the activating effect of these ions, however, is weak. In addition, potassium phosphate has a stabilizing effect even at comparatively low concentration.

We know that cobra venom contains the chlorides and phosphates of calcium, magnesium, and ammonia. These salts, most probably, are of little importance for the pharmacological and toxicological properties of cobra venom. On the other hand their presence is necessary for maintaining cholinesterase activity, both for the stability of this enzyme and for giving optimum activity. The comparatively high concentration of zinc in cobra venom is still obscure.

SUMMARY

The stability of cobra venom acetylcholinesterase in solutions has been investigated. In RINGER's solution the enzyme is stable for months when kept at 4.5° C. Water solutions deteriorate rapidly; at 25° C the reduction of esterase activity is 50 % in an hour. Dialysis causes a rapid decrease of activity; reactivation is not accomplished by adding the dialysate.

The effects of the chlorides of sodium, potassium, calcium, barium, strontium, and magnesium on enzyme stability are studied. Magnesium is by far the best stabilizing ion tested, sodium and potassium are least active in this respect. Magnesium also is an enzyme activator; this reactivation is a slow process.

Magnesium chloride and potassium chloride have no influence on the activity-substrate concentration relationship.

This work has been financially supported by *Statens Naturvetenskapliga Forskningsråd*.

The Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, University of Stockholm.

REFERENCES. 1. **Iyengar, N. K., Sehra, K. B., Mukerji, B., and Copra, R. N.**, Current Sci. (India) **7** (1938) 51. — 2. **Zeller, E. A.**, Advances in Enzymol. **8** (1948) 459. — 3. **Blaschko, H. and Holton, P.**, Brit. J. Pharmacol. **4** (1949) 181. — 4. **Augustinsson, K.-B.**, Arch. Biochem. **23** (1949) 111. — 5. **Augustinsson, K.-B.**, Acta Chem. Scand. **5** (1951) 699, 712. — 6. **Mounter, L. A.**, Biochem. J. **49** (1951) P. 45; *ibid.* in the press. — 7. **Augustinsson, K.-B.**, in **Sumner-Myrbäck**, The Enzymes, Academic Press, New York, I, Part 1 (1950) pp. 443–472. — 8. **Augustinsson, K.-B.**, Acta Physiol. Scand. **15** (1948) Suppl. 52. — 9. **Nachmansohn, D. and Lederer, E.**, Compt. rend. soc. biol. **130** (1939) 321; Bull. soc. chim. biol. **21** (1939) 797. — 10. **Delezenne, C.**, Ann. inst. Pasteur **33** (1919) 68, especially p. 103. — 11. **Mendel, B. and Rudney, H.**, Science **102** (1945) 616. — 12. **Mendel, B.**, personal communication.

Tryckt den 22 april 1952

Uppsala 1952. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB



Coccarboxylase as a phosphate carrier

By KARL-HEINZ KIESSLING and PER ERIC LINDAHL

The rôle of coccarboxylase (thiamine-pyrophosphate) was earlier considered to be only that of a decarboxylating coenzyme. However, LIPMANN (1937) working *in vitro* with *B. delbrückii* arrived at the conclusion that coccarboxylase acts at the same time as a dehydrogenating coenzyme. Later this function of coccarboxylase has been questioned (LIPMANN and PERLMANN, 1938; STERN and MELNICK, 1940). Finally it has been suggested that in such cases dehydrogenation is performed by aloxazine-adenine-dinucleotide. Besides it is possible that by means of its pyrophosphate group coccarboxylase should be able to function as a phosphate carrier. As far as we have been able to establish from literature, this has neither been discussed nor investigated.

According to WARBURG and CHRISTIAN (1939) the oxydation of phosphoglyceraldehyde to diphosphoglyceric acid by cozymase is coupled with the uptake of inorganic phosphate. On the other hand it was shown by LINDAHL *et al.* (1946, 1947) that the phosphate groups of the cozymase molecule are exchanged in living fermenting baker's yeast. This may imply that the cozymase molecule acts at the same time as a dehydrogenating and transphosphorylating coenzyme. A similar complex function of the coccarboxylase molecule may be expected.

Thiamine and coccarboxylase have been shown to be present simultaneously in tissues, and they are supposed to exist *in vivo* in a dynamic equilibrium. In the liver which has chiefly been the material of this investigation, the equilibrium is strongly displaced towards coccarboxylase (OCHOA, 1942, p. 20). Thus there may be only a very low phosphorylation in connection with coccarboxylase synthesis. This reaction has been described to occur in the liver of avitaminous animals (OCHOA and PETERS, 1938 a) as well as *in vitro* (OCHOA and PETERS, 1938 b).

In our experiments we have used mitochondria from the mammalian liver, suspended in a veronal buffer of pH 7.2 and containing radioactive inorganic phosphate (1 mC pr 100 ml suspension). To this suspension, prepared according to GREEN *et al.* (1948), pyruvic acid was added as a substrate. The suspension of mitochondria was divided into two equal parts, A and B, which were incubated partly in shaking Vernbach flasks at 37° C aerated with O₂, partly in Warburg manometer flasks treated in the same way. The central well of the flasks contained KOH. In sample A "sparking" of pyruvate oxidation is induced by an addition of bicarbonate and fumarate, in sample B not. Because of this a great difference in the metabolic rate of the two samples (cf. GREEN *et al.*, 1948) was obtained (registered as O₂-consumption with the aid of Warburg apparatuses). After 20 minutes, *i.e.* while the system is still working

optimally, the reaction was interrupted by cooling down the samples to about 2° C. According to GREEN *et al.* (1949) inorganic phosphate was removed by repeated washings at this temperature. The proteins were precipitated by the addition of trichloroacetic acid (final concentration 5 %) which does not dissolve nucleic acids in concentrations up to 6 % (SCHNEIDER, 1945).

Cocarcboxylase is only partly precipitable with barium ions, but is carried down in alcoholic solution by the Ba-precipitates of other pyrophosphate compounds (LOHMANN and SCHUSTER, 1937). Because of this cocarcboxylase was separated from hexose and triose phosphate by adding ethanol and Ba-acetate to the trichloroacetic extracts (cf. EGGLETON and EGGLETON, 1939; STONE, 1940).

By a series of operations, i.e. precipitations with ethanol and with methanol, fractionated precipitation with methanol + ether (LOHMANN and SCHUSTER, 1937) and finally purification by the aid of paper chromatography, it was possible to obtain cocarcboxylase free from other phosphate-containing compounds. The chromatography (solvent: Na₂HPO₄-amyl-alcohol-mixture, SNELLMAN and GELOTTE, 1951) was furthermore used as a control of the cocarcboxylase not being contaminated by traces of flavine-adenine-dinucleotide, cozymase or ATP. All these compounds have Rf-values in this solvent well separated from that of cocarcboxylase. The cocarcboxylase spots were identified by means of the absorption of U-V-light and cut out. Their radioactivities were measured, and the amount of the coenzyme in each spot was determined after extraction according to LOHMANN and SCHUSTER (1937). The specific radioactivities calculated from these figures are presented in Table 1.

Table 1

Exp.	Metabolic rate:	Spec. radioactivity:
	$\frac{\text{sample A}}{\text{sample B}}$	$\frac{\text{sample A}}{\text{sample B}}$
1	2.91	2.98
2	3.00	3.24
3	4.15	2.37
4	2.20	2.45

The related experiments demonstrate 1) that radioactive phosphate is taken up into the cocarcboxylate molecule, i.e. that an exchange of phosphate groups is taking place, 2) that this exchange is markedly greater in an actively working system and 3) that this process is fairly proportional to the metabolic rate measured as oxygen consumption of the system.

Institute of Zoophysiology, University of Uppsala.

REFERENCES. Eggleton, G. P. and Eggleton, Ph., 1939, *J. Physiol.* **68**, 193. — Green, D. E., Loomis, W. F., and Auerbach, V. H., 1948, *J. Biol. Chem.* **172**, 389. — Green, D. E., Atchley, W. A., Nordmann, J., and Teply, L. J., 1949, *Archives of Biochem.* vol. 24, no. 2, 359. — Lindahl, P. E., Malm, M., Strindberg, B., and Lagergren, B. M., 1946, *Nature*

158, 746. — **Lindahl, P. E.** and **Strindberg, B.**, 1947, Proceedings of the 6th International Congress of Experimental Cytology. Exp. Cell Res. Suppl. 1, Stockholm, 1949. — **Lipmann, F.**, 1937, *Enzymologia* **4**, 65. — **Lipmann, F.** and **Perlmann, G.**, 1938, *J. Am. Chem. Soc.* **60**, 2574. — **Lohmann, K.** and **Schuster, Ph.**, 1937, *Biochem. Z.* **294**, 188. — **Ochoa, S.**, 1942, In: *The Biological Action of the Vitamins*, Edited by E. A. Evans, Chicago. — **Ochoa, S.** and **Peters, R. A.**, 1938 a, *Bioch. J.* **32**, 1501. — — —, 1938 b, *Nature, Lond.* **142**, 356. — **Schneider, W. C.**, 1945, *J. Biol. Chem.* **161**, 293. — **Snellman, O.** and **Gelotte, B.**, 1951, *Nature* **168**, 461. **Stern, K. G.** and **Melnick, J. L.**, 1940, *J. Biol. Chem.* **135**, 365. — **Stone, W.**, 1940, *J. Biol. Chem.* **135**, 43. — **Warburg, O.** and **Christian, W.**, 1939, *Biochem. Z.* **274**, 112.

Tryckt den 22 april 1952

Uppsala 1952. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB



Resistenz und Immunität gegen Tumoren I. Wachsende und retrograde Impftumoren.

VON HANS VON EULER

In vorhergehenden Mitteilungen¹ haben wir die Abwehr-Vorgänge gegen Tumor-Implantate und zwar besonders den Einfluss verschiedener Vorbehandlungen auf das Schicksal der Impftumoren auf Grund eigener Versuche und Erfahrungen besprochen. Dass Tiere gegen Tumor-Implantate durch geeignete Vorbehandlung mit dem gleichen, virulenten Tumorgewebe resistent gemacht werden können ist eine anerkannte, durch die Arbeiten von UHLENHUTH³ und von BASHFORD begründete und durch die neueren Ergebnisse von DOMAGK⁴, HACKMANN, KLINKE, HAMPERL, DITTMAR u. a. festgestellte Tatsache. Andererseits sind viele Versuchsreihen beschrieben worden, bei welchen ein anfänglich kräftig wachsendes Tumor-Implantat nach einiger Zeit zum Stillstand kommt und dann bis zum völligen Verschwinden zurückgeht. Das Eintreten solcher „Regressionen“ ist, wie in unseren oben erwähnten Mitteilungen betont wurde, durch verschiedene Umstände bedingt: Neben dem Alter,^{3,4} besonders der Virulenz des Implantates spielt die „Abwehr“ des Wirtsorganismus eine wesentliche Rolle. (BORST, BRETTSCHEIDER, MACKAY u. a.)

Die Ausbreitung des Implantates wird durch dessen Wachstums-Faktoren unterstützt, während der entgegengesetzt gerichtete Kampf des resistent oder immun gewordenen Wirtsgewebes gegen den Tumor durch Abwehr-Enzyme und deren Reaktionsprodukte geführt wird, über deren Spezifität bis jetzt noch wenig sichere Anhaltspunkte vorliegen.

Die Isolierung und chemische Charakterisierung der Wuchs- und der Abwehrstoffe, die gleichzeitig im und am Tumor-Implantat und dessen Umgebung auftreten, bildet zweifellos eine vordringliche Aufgabe der Krebsforschung und ist eine Voraussetzung für die Einsicht in den Kampf, den der tumortragende Organismus gegen das maligne Gewebe führt.

Unter den älteren Angaben über immunisierende Wirkung von Impftumoren seien ausser den oben zitierten noch Arbeiten von MAISIN und VYVER⁶, von YAMAGIVA⁷, FIBIGER und

¹ BETH v. EULER u. HANS v. EULER, Dieses Arkiv 2, Nr. 4; 1949/50. — 2, Nr. 38; 1950. EULER u. Mitarb. Dieses Arkiv 1, 12; 1948/49.

² BETH v. EULER u. HANS v. EULER, Z. Krebsforsch. 57, 501; 1951.

³ P. UHLENHUTH, Z. Immun.forsch. 90, 98 1917.

⁴ G. DOMAGK u. CHR. HACKMANN, Z. Krebsforsch. 42, 192; 1935.

⁵ CHR. HACKMANN, Z. Krebsforsch. 57, 164; 1951.

⁶ MAISIN u. VYVER, C. r. Soc. Biol. 94, 772; 1926.

⁷ YAMAGIVA u. Mitarb., Virchows Archiv 261, 75; 1926.

BITTNER¹ erwähnt. Letzterer Forscher fand, dass die Impfung mit dem Sarkom 180 keinen Schutz gegenüber Spontantumoren erzeugt.

CH. HACKMANN² beobachtete an einem hochbelasteten Mäusestamm nach Entfernung der Spontantumoren keine Resistenz gegen Rückimpfung des eigenen Tumors, vielmehr eine sehr grosse Neigung zu Rezidiven (im Gegensatz zu Beobachtungen die am Ehrlich-Mäusecarcinom gemacht wurden). Bei Injektion von 180 Mäusen aus dem hochbelasteten Stamm mit zellfreiem Extrakt aus Spontantumoren wurde nach 5 Injektionen während 4 Wochen kein Unterschied in der Häufigkeit der Tumoren gegenüber 201 unbehandelten Mäusen beobachtet.

Mit transplantablen Sarkomen, die mit Dibenzanthracen an vier reinen Mäuse-Inzuchtstämmen hervorgerufen worden waren, fand M. R. LEWIS 100 %iges Angehen der Tumoren, wenn die geimpften Tiere dem gleichen Stamm angehörten, auf dem der Tumor gewachsen war. Auf Tiere aus anderen reinen Mäusestämmen übergeimpft, gingen die Tumoren nach einiger Zeit zurück.

Die Verimpfung des zellfreien Tumorpresse-saftes der retrograden Tumoren, die Behandlung mit dem durch Hitze, Alkohol oder chemische Stoffe inaktivierten Gewebe, ruft nach LEWIS keine Immunität hervor. Auch Blut und normales Gewebe der Tumor-immunen Tiere erzeugen keine Tumorabwehr.

Die in reinen Inzuchtstämmen *chemisch hervorgerufenen Tumoren* verhalten sich bei der Transplantation wie *spontane Tumoren*, indem sie nie retrograd werden und keine Immunität hervorrufen. Die spontan entstehenden malignen Zellen besitzen mit den normalen Zellen eines Individuums noch eine gewisse Verwandtschaft.

Wie HACKMANN betont, handelt es sich beim Angehen eines Impftumors nicht um die *Entstehung* einer malignen Geschwulst, sondern nur um das *Weiterwachsen* bereits malignen Gewebes in einen individuumfremden Organismus.

RÖSSLE³ verglich die anfänglichen Veränderungen von Lebertransplantaten und Tumortransplantaten und fand, dass die lokale Reaktion des Wirtsorganismus in beiden Fällen prinzipiell gleich ist, sodass sich das Verhalten der Impfgeschwülste als ein Transplantationsvorgang darstellt. Dafür spricht auch die Tatsache, dass die Eingriffe im Bereiche des Reticulo-endothelialen Systems, die das Angehen der Impftumoren erleichtern, auch eine glatte Einheilung des homologen normalen Transplantates bewirken.⁴

Behandelt man nach SYMEONIDIS⁵ Mäuse mit der Suspension von Mäuseleberzellen und beimpft nach einiger Zeit diese Tiere mit kleinen Mengen von Lebergewebe, so zeigt der Vergleich der mikroskopischen Befunde an den Transplantaten bei vorbehandelten und bei nicht vorbehandelten Tieren, dass durch die Vorbehandlung das Angehen des Transplantates erschwert wird. Die örtliche entzündliche Reaktion um das überpflanzte Leberstück setzte in den Versuchen von SYMEONIDIS an den nicht vorbehandelten Tieren rascher und stärker ein.

Vergleich zwischen wachsenden und retrograden Sarkomen

Unsere Untersuchung, die wir in letzter Zeit, hauptsächlich mit Benzpyren-Sarkomen, angestellt haben, konzentrierte sich zunächst auf die Frage, welche Unter-

¹ BITTNER, Am. J. Cancer 28, 121; 1926.

² CHR. HACKMANN, Z. Krebsforsch. 50, 352; 1936.

³ R. RÖSSLE, Sitz. Ber. Preuss. Akad. d. Wiss. phys. math. Kl. 1936.

⁴ MARINE u. MANLEY, J. exp. Med. 22, 113; 1920.

⁵ A. SYMEONIDIS, Virchows Archiv 302, 443; 1938. — 304, 271; 1939.

schiede sich zwischen dauernd wachsenden und retrograden Sarkomen nachweisen lassen. Über dieselben ist bezgl. ihrer Erzeugung, der Bedingungen ihres Wachstums und bezgl. ihres Habitus folgendes zu sagen:

Erzeugung. Wir haben bisher in den meisten Fällen kleine Gewebe-Stückchen von etwa 20–30 mg aus dem Sarkom einer wenige Minuten vorher getöteten Ratte mittels Trokar unter die rasierte und mit Aether-Alkohol gewaschene Haut unter möglichst sterilen Bedingungen auf ein junges Individuum des gleichen Stammes übergeimpft, und zwar meist in den hinteren Rückenteil. Stets wurden darauf geachtet, dass das Implantat völlig nekrosenfrei war. Immerhin variierte die prozentische Zahl der „Angänge“ bei den einzelnen Impfungen erheblich.

Wachstum. Etwa 8 Tage nach der Impfung war das Implantat bis zur Erbsengrösse herangewachsen, nach weiteren 8 Tagen zeigte es das Volumen einer Bohne und konnte schliesslich das Gewicht von 80–120 g erreichen. Den exstirpierten Tumor fanden wir manchmal mit Nekrosen verschiedener Konsistenz gefüllt, in einzelnen Fällen waren jedoch sogar grosse Tumoren fast ganz nekrosefrei und fest. In jedem Fall erwies sich das Tumorrinnere auffallend arm an Blutgefässeln. Der Tumor wuchs durch Ausbreitung der äusseren Schaaale.

„Regression“ bezw. Wachstums-Stillstand trat nach verschiedenen Zeiten ein, wobei das Implantat verschiedene Grösse erreicht hatte. Oft dauerte der Stillstand oder ein periodenweises Ab- und Zunehmen des Tumors mehrere Wochen, um dann entweder in ein starkes Wachstum oder in ein völliges Verschwinden überzugehen.

Durch welche Umstände eine Regression begünstigt wird lässt sich allgemein kaum sagen. Bei der Regression der implantierten Tumoren wird wohl in der Regel die Virulenz des Implantates gering sein, d. h. seine Enzymsysteme der Synthese sind geschwächt, während andererseits die Wachstumsstoffe des umgebenden Wirtsorganismus — solange dieser normal ist — gut funktionieren.

Das normale Tier kann sich gegen die Ausbreitung eines von einem gleichstammigen Tier transplantierten Tumors auf verschiedene Weise schützen:

1) *Durch Ausbildung eines cancerolytischen, als „Antikörper“ fungierenden Enzymsystems.* Das Auftreten anti-tumoraler Stoffe, und zwar von Enzym-Natur, ist ja wiederholt angenommen worden. Der Mechanismus sowie die genauere Lokalisierung ihres Entstehens ist — wie die Natur der Antikörper überhaupt — noch ganz unklar. Nach unseren orientierenden Versuchen scheint der oft als „Antikörper“ angesprochene Wirkstoff die Labilität eines Enzyms (vermutlich eine Nukleoprotease) zu besitzen, welcher, wie auch manchen anderen Enzymen, die Fähigkeit der Adaption an ein malignes Substrat zukommt.

2) *Durch Vermehrung und Aktivierung seiner eigenen normalen Wachstums-Ergone (Hormone, Vitamine, Co-Enzyme).* Manche Forscher nehmen an, dass auch der menschliche Organismus durch den in dieser Weise verbesserten Stoffwechsel den Angriff vonseiten der Krebszellen überwindet (Spontan-Heilung). Für die Annahme, dass Selbst-Heilung (Regression) von tierischen Spontantumoren vorkommt, scheinen bis jetzt nur unzureichende Anhaltspunkte vorzuliegen. Immerhin werden von aussen zugeführte Ergone (Vitamine) von normalen und von malignen Zellen in verschiedenem Grad aufgenommen und verwertet.

Die anscheinende Unabhängigkeit des malignen Wachstums von regulativen, besonders hormonalen Vorgängen im Organismus macht es wahrscheinlich, dass

¹ Vgl. auch CHR. HACKMANN, Z. Krebsforsch. 57, 164; 1950.

eine wesentliche, anticanceröse Wirkung des normalen Organismus darin liegt, dass nur normales, nicht aber canceröses Gewebe vom übergeordneten Wachstumshormon des Hypophyse-Vorderlappens, das ja ein Hormonprotein und zwar wohl ein Hormon-Enzym ist, stimuliert wird. Die psychische Beeinflussung des Krebsabwehr-Kampfes hat dort wohl auch seinen Ausgangspunkt.

Mit zunehmender Atrophie des Hypophysen-Vorderlappens bei hohem Alter nimmt diese Begünstigung des normalen Wachstums immer mehr ab.

3) Durch Verminderung der *Permeabilität der an das Tumor-Implantat grenzenden Zellen* und durch *Abkapselung* gegen den Tumor mittels einer Bindegewebs-Schicht.

4) Durch *Hemmung oder Modifizierung der Nahrungszufuhr zum Tumor* und damit durch Beeinflussung des Stoffwechsels. In Tumoren findet man stets ein tief liegendes Oxydationspotential. Das besonders durch H. HELLSTRÖMS Messungen nachgewiesene Faktum¹, dass die Tumorzellen cytochromdefekt sind, d. h. arm an den Komponenten des Cytochrom-Systemes, besonders an Cytochrom c, Cytochromoxydase und Diaphorase und ausserdem an Succino-Dehydrase, sehen wir, wie auch die anormalen Konzentrationen von Cystein und reduziertem Glutathion — als eine *Folge*, nicht, wie öfters angegeben wird, als eine *Ursache* der cancerösen Degeneration an.

Die verschiedenen tierischen Organe weisen eine *ungleiche Resistenz* gegen Tumoren auf. Dass *Milz* nur ganz selten Metastasen enthält kann nach den Ergebnissen von DOMAGK², K. H. BAUER³, KALLOS⁴ u. a. als eine feststehende Tatsache angesehen werden. Man hat deswegen wiederholt einen Schutzstoff aus Milz zu extrahieren versucht, jedoch ohne zu eindeutigen Resultaten zu kommen. Ob die Milz ein als Antikörper gegen Tumor-Nukleoproteine wirksames proteolytisches Enzym enthält, wird in diesem Institut geprüft.

Dass das *übergeordnete Sexualhormon der Hypophyse* und das *Prolan* die Entwicklung von Tumoren verzögern, wird durch zahlreiche Beobachtungen, besonders von B. ZONDEK⁵ gestützt. Auch nach eigenen Erfahrungen kann ich nicht in Abrede stellen, dass übergeordnete Hormone der Hypophyse an antitumoralen Wirkungen wesentlich beteiligt sind.⁷

Im Anschluss an Versuche über den Einfluss von Kobaltsalzen auf die Katalase-Bildung in Ratten-Organen (EULER u. GLASER⁸) haben wir in den letzten 2 Jahren nach Beziehungen gesucht zwischen den Katalase-Wirkungen von Organen (Leber und Nebennieren) normaler und sarcomatöser Ratten und ihrem Gehalt an freiem und gebundenem Eisen.

Die besonders durch die eingehenden Versuche von GREENSTEIN⁹ festgestellte Tatsache, dass die Katalase-Wirkung in Lebern canceröser Ratten wesentlich niedriger ist als diejenige in normalen Rattenlebern konnte von uns durchaus bestätigt werden. In einer kurzen vorläufigen Mitteilung¹⁰ wurde folgendes erwähnt:

¹ EULER u. H. HELLSTRÖM, Z. physiol. Chem. 255, 159; 1938. — 260, 163; 1939.

² G. DOMAGK, Med. u. Chemie. 2, 62; 1934.

³ K. H. BAUER u. DECKNER, Beitr. z. klin. Chirurgie 162, 513; 1935.

⁴ P. KALLOS u. L. KALLOS-DEFFNER, Schweiz. Zs. allg. Path. u. Bakt. 3, 11, 140; 1940.

⁵ B. ZONDEK. Siehe Monographie, 2. Aufl. s. 355 u. 363.

⁶ EULER, I., RÖNNESTAM-SÄBERG u. B. v. EULER, Z. physiol. Chem. 270, 225; 1941.

⁷ Vgl. EULER u. B. SKARZYNSKI, Biochemie der Tumoren, Stuttgart, Enke; 1941.

⁸ EULER u. A. GLASER, D. Med. Wochenschr. 75, 631; 1950.

⁹ J. P. GREENSTEIN u. Mitarb., J. Nat. Cancer Inst. 2, 345 u. 589; 1942. — 3, 283; 1943.

¹⁰ EULER, Kem. Arb. 14, II, Januar 1951.

„Es ist auch bekannt, dass der Fe-Gehalt von Organen und Geweben, z. B. von Leber oder Haut¹ beim Übergang vom normalen in den kanzerösen Zustand abnimmt. Auch die Fe-Porphyrin-Verbindung, welche in der Katalase vorliegt, ist in der Leber kanzeröser Ratten erniedrigt.“ (COLWELL, BRAHN², GREENSTEIN³, WEIL-MALHERBE⁴, EULER u. GLASER.⁵)

„Wenn eines der Fe-Porphyrine inaktiviert wird, sei es durch Reduktion oder durch Fe-Verlust, so verliert der Organismus einen den normalen Stoffwechsel befördernden Stoff. Inwieweit der Rest des Moleküls eine krebserregende Wirkung ausübt, lässt sich noch nicht bestimmt sagen; der Umstand, dass nach wiederholter Injektion der Extrakte kanzeröser Gewebe Anzeichen von Krebsbildung erhalten werden, kann von einem degenerierten Eisen-Porphyrin herrühren.“

Kurz nach der Drucklegung dieser Mitteilung fanden wir eine bereits früher erschienene, sehr bemerkenswerte Arbeit von WARO NAKAHARA und FUMIKO FUKUOKA⁶ über Toxohormon, eine charakteristische toxische Substanz des Krebsgewebes, in welcher Arbeit die japanischen Forscher mitteilen, dass „the lowering of liver catalase in tumor bearing animals, can be counteracted by dietary supply not only of dried liver or blood powder but also of excess ferric chloride. This fact was demonstrated in the case of mice bearing transplanted sarcoma and also of normal mice injected with potent toxohormone isolated from human as well as mouse tumors.“

Diese Befunde von NAKAHARA und FUKUOKA haben unseren Arbeits-Kreis um so mehr interessiert, als bei Jensen-Sarkomen in diesem Institut schon 1940 M. MALMBERG und 1947 INEZ RÖNNESTAM und MARIO BRACCO nach Injektion von Knochenmark sowie von Hämoglobin bzw. Hämatin Tumor-Rückgänge feststellen konnten (vgl. auch Kem. Arb. 14. l. c.). Als wir nun, um einen Einfluss der Blutbildung auf die Entwicklung von Walker-Tumoren zu untersuchen, im Anschluss an frühere, mit Cu-Chelaten und Kobalt-Komplexen ausgeführte Versuche, auch Hämoglobin in Walker-Tumoren tragende Ratten injizierten, ergab sich kein eindeutiger Regressions-Effekt. *Auch die erwartete Katalase-Bildung in der Leber nach Hämoglobin-Injektionen trat nicht ein.*

Wir haben deshalb, nach Kenntnisnahme der japanischen Ergebnisse oben erwähnte Versuche mit Benzpyren-Sarkomen wiederholt (da uns seit Frühjahr 1950 keine geeigneten Jensen-Sarkome mehr zur Verfügung standen) und zwar haben wir nach intramuskulärer Injektion von Hämin sowie nach Eingabe per os von FeCl_3 und von Fe-Citrat mit und ohne Zusatz von Hefenukleinsäuren wiederum die Katalase-Wirkung der Lebern nach der von uns früher beschriebenen Titrationsmethode mit KMnO_4 bestimmt.

Der Effekt dieser Eisen-Diät war durchgehends sehr gering, insofern die Katalase-Wirkung der Lebern von Ratten, welche 10–20 ccm grosse wachsende Sarkome trugen, nach Zufuhr von insgesamt rund 8 mg Fe^{III} per 100 g-Tiere während 2 Wochen die Katalase-Wirkung der Lebern der unbehandelten, gleich grossen Sarkome tragenden Ratten in keinem Fall um mehr als 15 %, im Mittel um nicht mehr als 6 % übertraf, ein Effekt, der bei dem verhältnismässig kleinen Versuchsmaterial innerhalb der Versuchsfehler fällt und keinesfalls als signifikativ bezeichnet werden kann. Etwas grösser war der Effekt der Leber-Diät.

¹ C. CARRUTHERS a. V. SUNTZEFF, J. Biol.

² B. BRAHN, Sitz. Ber. preuss. Akad. d. Wissensch. 1916, 478.

³ Siehe FUSSN. 9, S. 292.

⁴ A. WEIL-MALHERBE a. R. SCHADE, Biochem. J. 43, 118; 1948.

⁵ Siehe FUSSN. 8, S. 292.

⁶ W. NAKAHARA a. FUMIKO FUKUOKA, Gann, 40, 45; 1949.

Es bleibt noch zu untersuchen, ob der Zusatz Fe-bindender Stoffe¹ im Sinne von NAKAHARA und FUKUOKA zu einer Vergrößerung der Katalase-Wirkung bei sarkomtragenden Ratten führt.

Im Tumor selbst (Benzpyren und Jensen-Sarkom) fanden wir — in Übereinstimmung mit GREENSTEIN — die Katalase-Wirkung nie auffallend klein; ob eine Vergrößerung derselben über den Mittelwert in unseren 4 Fällen nach Leberdiät eingetreten war ist unsicher. Der quantitative Nachweis war um so schwieriger, als gleichzeitig (in 3 Fällen) eine Abnahme der Sarkomgrösse eintrat.

Nach wiederholten Injektionen von Hämoglobin an unserem *Wallentuna*-Stamm konnten wir häufig Regressionen feststellen. Da aber Spontanheilung der *Walker*-Tumoren bei den als Kontrolle angewandten Tieren in vielen Fällen vorkam, können wir keine sicheren Schlüsse daraus ziehen.

Der folgende Auszug aus unserem Protokoll (Februar-März 1951) zeigt, wie die Versuche angestellt wurden, und wie die regressiven bzw. wachsenden Walker-Tumoren sich unter unseren Versuchsbedingungen entwickelt haben.

Ratte Nr	Gewicht g	Alter Tage	2 mg Hämoglobin inje. Febr. 51	Entwicklung d. Tumors	
99	226	86	6, 9, 13, 16, 19	6. II	3,3 ccm
				19.	0,7 „
				24.	„kleine Bohne“
				6. III	0
108	250	86	„	6. II	5,4 ccm
				19.	Reiskorn + „Bohne“
				24.	„ 0 „
				6. III	0
101	259	86	„	6. II	5,6 ccm
				19.	0
95	207	86	„	6. II	7,9 ccm
				19.	13,9 „
				24.	37,6 „
				16. III	Gew. 135 g
103	224	86	„	6. II	5,4 ccm + „Bohne“
				19.	Spur
				20.	Getötet
117	105	120	11, 13, 20 + 1 γ CuSO_4	11. II	1,7 ccm
				20. II	Gew. 39 g

Die Widersprüche, welche man in der Literatur über die in Tumoren auftretenden Ergone findet, dürften zum grossen Teil auf dem bekannten Umstand beruhen, dass in vielen Tumoren gleichzeitig Wuchsstoffe und Hemmungsstoffe vorkommen, die — besonders bei Versuchen mit Tumorextrakten *in vitro* — oft nicht erkannt werden, da sich ihre Wirkungen kompensieren.

¹ Schon auf Grund unserer Versuche über den Einfluss des Cytochrom-Mangels haben wir eine grössere Anzahl von SH- oder NH-haltigen Stoffen deren Fe-Komplexe als Fe-Reserven im Tierorganismus in Betracht kommen, auf ihre tumorhemmende Wirkung hin untersucht, bisher allerdings ohne einheitliches Resultat.

Wir haben deswegen erneut nach Methoden gesucht, die sich zum getrennten Nachweis bzw. zur Isolierung dieser antagonistischen Ergone eignen. Zunächst werden wachsende und in Regression befindliche Benzpyren-Sarkome vergleichend untersucht, und zwar einerseits histologisch, andererseits durch Papier-Chromatographie. Wir besprechen die Ergebnisse dieser Versuche im II. Teil dieser Arbeit, die mit Unterstützungen aus *Konung Gustaf V:s Jubileums-Fond* und *Lotten Bohmans Fond för kräftsjukdomens bekämpande* ausgeführt wurde.

Stockholm, Universität, Vitamin-Institut.

Tryckt den 29 maj 1952

Uppsala 1952. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB



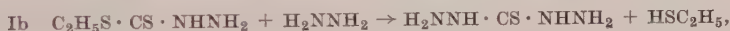
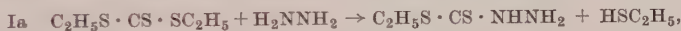
On the Ethyldithiocarbhydrazide and its Hydrazones

By

JAN SANDSTRÖM

1. Introduction and survey

BUSCH and STARKE (1), in reactions between potassium dithiocarbazine and methyl iodide and benzyl bromide, obtained the methyl- and benzyl dithiocarbhydrazides in the form of crystalline substances, with m.p. 79° and 125° respectively. In the corresponding reaction with ethyl bromide they obtained a viscous oil, which they did not further investigate. However, when the author, on the suggestion of Professor B. HOLMBERG, tried to prepare the ethyldithiocarbhydrazide by decomposing diethyl trithiocarbonate with hydrazine, according to the reaction scheme Ia:



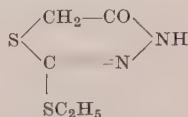
the ethyldithiocarbhydrazide was obtained as a crystalline product, with m.p. 39°.5–40°.5 after recrystallization. This product also contained a little thiocarbhydrazide, which was apparently formed by the reaction Ib. When then an attempt was made to prepare ethyldithiocarbhydrazide from ethyl bromide and hydrazinium dithiocarbazine, it was obtained immediately in the crystalline state and in very good yield. Since the ethyldithiocarbhydrazide has thus become an easily accessible substance, it has been subjected to some experiments to test its reaction possibilities in different directions.

According to its constitution, the ethyldithiocarbhydrazide shows the properties of a weak base, and from its salts with acids, the hydrochloride, m.p. 131°–132°, and the neutral sulphate, m.p. 158°–158°.5, have been prepared. Particularly, the sulphate is characteristic and easy to prepare, and because the ethyldithiocarbhydrazide gradually decomposes and gives sticky, evil-smelling products, it is proper to transform it into the sulphate for long storing. — Since it can react as an *isothio* compound, the ethyldithiocarbhydrazide is soluble in alkalies, and when solutions of heavy metals were added to these solutions, more or less characteristic precipitates were obtained. The precipitate formed on addition of zinc sulphate was crystalline and normally composed according to II. — In the form of an alkali salt the ethyldithiocarbhydrazide reacts with haloid esters. However, in reactions with methyl iodide and ethyl bromide only oils were obtained. In reaction with bromoacetate, after acidifying the reaction mixture, a crystalline product was obtained, m.p. 132°–132°.5, which, however, was found to consist of 2-ethylthio-5-oxo-5,6-dihydro-1,3,4-thiapyridazine, III, formed by splitting off water from the primary product.

The same product was obtained by splitting off ammonia in the corresponding reaction with chloroacetamide.

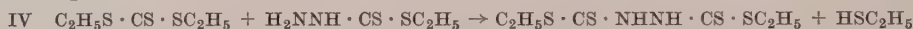


II

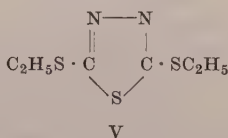


III

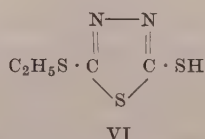
The reaction Ib has been verified by the reaction between pure ethyldithiocarbhydrazone and hydrazine. In this connection, some attempts were made to prepare thiosemicarbazides by reactions with ammonia and amines, though without success. Like thiobenzhydrazide, according to HOLMBERG (2, 3), and xanthogenhydrazides, according to WANGEL (4), the ethyldithiocarbhydrazone reacts with acylated thio-glycollic acid under splitting off the mercapto acid and primarily giving a symmetrically disubstituted hydrazine. Therefore IV could also be a possible reaction following Ia:



In the preparation of ethyldithiocarbhydrazone from diethyl trithiocarbonate, no products have been found according to this reaction. However, when the trithio-carbonate reacted with the ethyldithiocarbhydrazone in strongly alkaline solution, a product, m.p. 80°–82°, was obtained, which might have been bis-ethyldithiocarbhydrazone, but its decomposition was so fast, that it could not be analyzed. In this decomposition, hydrogen sulphide and ethanethiol was split off. The decomposition product accordingly consisted of a mixture of 2,5-bis-ethylthio-1,3,4-thiadiazole V, m.p. 21°–22°, and 2-mercapto-5-ethylthio-1,3,4-thiadiazole VI, m.p. 126°–127°.



V

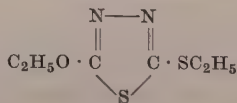


VI

In the same way as with diethyl trithiocarbonate, the ethyldithiocarbhydrazone reacted with ethylxanthogenacetic acid. 1-Ethylxanthogen-2-ethyldithiocarbhydrazone VII, m.p. 90°–91°, was formed, and when heated, it split off hydrogen sulphide and gave 2-ethylthio-5-ethoxy-1,3,4-thiadiazole VIII, m.p. 2°–3°.

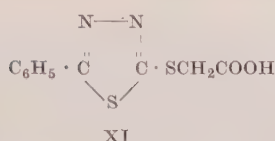
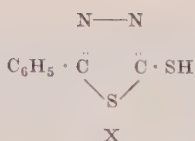
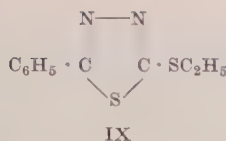


VII

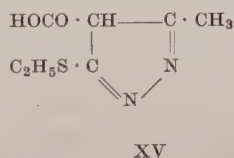
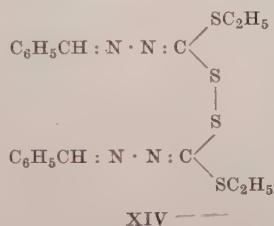
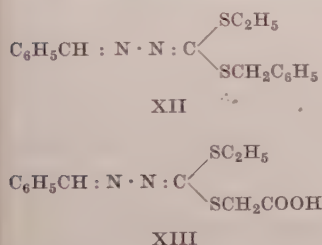


VIII

The ethyldithiocarbhydrazone reacted in the expected way also with carboxymethyl dithiobenzoate, but the primary product immediately split off hydrogen sulphide and ethanethiol. The reaction products were 2-ethylthio-5-phenyl-1,3,4-thiadiazole IX, m.p. 40°–41°, and 2-mercapto-5-phenyl-1,3,4-thiadiazole X, m.p. 215°–216°. The latter compound, in reaction with bromoacetate in alkaline solution, gave 2-carboxymethylthio-5-phenyl-1,3,4-thiadiazole XI, m.p. 186°–187°.



Ethyldithiocarbonylhydrazide reacts easily with aldehydes and ketones, though not always giving crystalline products. Its reaction products with *formaldehyde* and *acetaldehyde* were obtained as viscous oils, while the *benzaldehyde* and *furfural ethyldithiocarbonylhydrazones* were crystalline, m.p. 129°–129.5 and 133°–134° respectively. The reaction between benzaldehyde ethyldithiocarbonylhydrazone and hydrazine gave the previously unknown monobenzaldehyde thioicarbonylhydrazone, m.p. 182°–183° .5, together with benzalazine and thioicarbonylhydrazide. In alkaline solution, the benzaldehyde ethyldithiocarbonylhydrazone in reaction with ethyl bromide gave an oil, but in its reaction with benzyl chloride, a crystalline product was obtained. It had the composition of benzaldehyde S'-ethyl-S''-benzyl-*isodithiocarbonylhydrazone*, but its m.p. was 61°–73° and therefore it might consist of two stereoisomeric forms XII, like the corresponding product of benzaldehyde methylthioicarbonylhydrazone and benzyl chloride according to BUSCH and STARKE (1).



In the same way with bromoacetate, after acidifying, the benzaldehyde S'-ethyl-S''-carboxymethyl-*isodithiocarbonylhydrazone* XIII, m.p. 126°–127°, was obtained. By treating this product with hydrazine, the above (III) mentioned thiapyridazine derivative was obtained under the splitting off of benzaldehyde. When oxidized with iodine or pyridinium perbromide, the benzaldehyde ethyldithiocarbonylhydrazone gave the disulphide XIV, m.p. 132°–133°, which corresponds to its *isothioform*. The oxidation with iron (III) chloride also yielded a thiadiazole derivative, the above mentioned 2-ethylthio-5-phenyl-1,3,4-thiadiazole (IX). The corresponding products were obtained from benzaldehyde thiosemicarbazone according to YOUNG and EYRE (5)¹ and from benzaldehyde thiobenzhydrazone according to HOLMBERG (3). When furfural ethyldithiocarbonylhydrazone was oxidized in the same way, only the disulphide, m.p. 133°–134°, could be obtained, which corresponds to XIV.

With *acetone*, ethyldithiocarbonylhydrazide yielded a hydrazone, m.p. 71°–73°, which, on oxidation, gave a disulphide, m.p. 116°–117°. With *pyruvic acid* it condensed to a hydrazone of m.p. 149°–150°. The corresponding product with *ethyl acetoacetate* was an oil, which, on being treated with alkali, under ketonic hydrolysis gave the acetone ethyldithiocarbonylhydrazone. When the oil was oxidized with iodine, one molecule of hydrogen sulphide was eliminated, and ethyl 3-methyl-5-ethylthio-*isopyrazole-4-carboxylate*², m.p. 90°–91°, was formed. This ester, on hydrolysis

¹ See also FROMM (6) and HOGGARTH (7). ² Nomenclature according to MITCHELL (9).

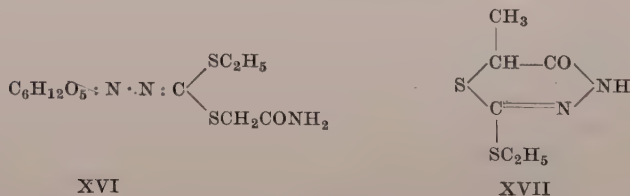
and after acidifying, gave the corresponding acid XV, m.p. 203° – $203^{\circ}.5$. When heated, the acid was decarboxylated and gave the liquid 3-methyl-5-ethylthio-isopyrazole. — The ethyldithiocarbhydrazones of *laevulic acid* and of *cyclohexanone* have m.p. $117^{\circ}.5$ – $118^{\circ}.5$ and 78° – 79° . The former gave no definable oxidation products, but the latter gave a disulphide, m.p. 105° – 107° . From common *camphor* a hydrazone has been obtained, m.p. $115^{\circ}.5$ – 116° , which shows $[\alpha]_D^{20} = -32^{\circ}.8$, $[M]_D^{20} = -88^{\circ}.8$ in absolute ethanol and $[\alpha]_D^{20} = -89^{\circ}.1$, $[M]_D^{20} = -241^{\circ}.0$ in benzene. When oxidized, it gave a disulphide, m.p. $152^{\circ}.5$ – $153^{\circ}.5$, which shows $[\alpha]_D^{20} = -82^{\circ}.6$, $[M]_D^{20} = -445^{\circ}.2$ in benzene. Finally *acetophenone* gave an ethyldithiocarbhydrazone, m.p. 130° – 131° , which could be oxidized to a disulphide, m.p. 125° – 126° .

As with thiobenzhydrazide, according to HOLMBERG (8), monosaccharides react with ethyldithiocarbhydrazone and give hydrazides or hydrazones. However, because of their instability and slight power of crystallization, they are not so fit for diagnostic purposes. The following sugar ethyldithiocarbhydrazides have been obtained in the crystalline state:

Ethyldithiocarb- hydrazide of	Melting point		In pyridine $[\alpha]_D^{20}$	$[M]_D^{20}$
<i>l</i> -Arabinose	134° – 135°		$+16^{\circ}.8$	$+45^{\circ}.0$
<i>d</i> -Glucose	85° – 90°		$+19^{\circ}.6$	$+58^{\circ}.5$
<i>d</i> -Mannose	136° – 138°	about $-7^{\circ} \rightarrow$	$-14^{\circ}.3$	about $-21^{\circ} \rightarrow -42^{\circ}.6^1$
<i>d</i> -Galactose	131° – 132°		$+16^{\circ}.8 \rightarrow +19^{\circ}.8$	$+50^{\circ}.5 \rightarrow +59^{\circ}.2$

l-Arabinose ethyldithiocarbhydrazone, when treated with iron (III) chloride, gave 2-*l*-arabinotetrahydroxybutyl-5-ethylthio-1,3,4-thiadiazole (V with $C_4H_9O_4$ instead of one SC_2H_5), m.p. 153° – $153^{\circ}.5$ and showing $[\alpha]_D^{20} = +36^{\circ}.5$, $[M]_D^{20} = +97^{\circ}.2$ in pyridine. From the corresponding *d*-galactose hydrazide, in the same way, 2-*d*-galactopenta-hydroxyamyl-5-ethylthio-1,3,4-thiadiazole, m.p. $185^{\circ}.5$ – 186° , was obtained, showing $[\alpha]_D^{21} = +25^{\circ}.8$, $[M]_D^{21} = +76^{\circ}.5$ in pyridine. No definable oxidation products could be obtained from the other hydrazides.

The reaction between *l*-arabinose ethyldithiocarbhydrazone and bromoacetate in alkaline solution gave a product, which, when acidified, decomposed to free arabinose and 2-ethylthio-5-oxo-5,6-dihydro-1,3,4-thiapyridazine (III).



In the reactions between sugar ethyldithiocarbhydrazides and chloroacetamide, only *d*-mannose ethyldithiocarbhydrazone gave a crystalline product, *d*-mannose *S'*-ethyl-*S''*-carbamoylmethyl-isodithiocarbhydrazone XVI, m.p. 155° – 156° and in pyridine showing $[\alpha]_D^{20} = +89^{\circ}.4$, $[M]_D^{20} = +317^{\circ}.9$. — With *d,l*- α -bromopropionic acid the hydrazides in question reacted as with bromoacetic acid. Faintly active thiapyridazine derivatives were obtained, XVII. When excess of bromopropionate was

¹ In 50 % aqueous ethanol.

added, the unaffected bromopropionic acid could be transformed into a mixture of stereoisomeric dithiodilactic acids, which also showed optical activity. The results, which were obtained with the different monosaccharides, are shown in the following table:

Sugar component	C_V^1	$[\alpha]_D^{20}$ for thiapyridaz ² .		$[\alpha]_D^{20}$ for dithio- dilactic acids. ⁴
		$n = 1^3$	$n = 2$	
<i>l</i> -Arabinose.....	<i>d</i>	+0°.6	+0°.9	+2°.4
<i>d</i> -Xylose.....	<i>d</i>	+0°.8	+0°.6	+2°.0
<i>d</i> -Glucose.....	<i>d</i>	+8°.5	+5°.8	+2°.1
<i>d</i> -Mannose.....	<i>l</i>	-0°.6	-0°.6	+3°.9
<i>d</i> -Galactose.....	<i>d</i>	+2°.6 ⁵	+6°.6	+4°.9
<i>d</i> -Fructose.....	<i>l</i>	+0°.5	+0°.6	-1°.6

¹ Assigns the configuration of the asymmetric carbon atom, which is adjacent to the carbonyl group. ² In absolute ethanol. ³ n = the ratio between bromopropionate and sugar ethyldithiocarbhydrazide. ⁴ In water, $n = 2$. ⁵ In pyridine $[\alpha]_D^{20} = +2°.0$.

These steric relations agree to a large extent with those found by HOLMBERG (8) for the sugar thiobenzhydrazides. C_V-d corresponds to dextro-rotatory and $C_V=l$ (except *d*-fructose) to leavo-rotatory thiapyridazine derivatives (the reverse by thiobenzhydrazides in pyridine). $C_V=d$ corresponds to a dextro-rotatory dithiodilactic acid product and vice versa (except *d*-mannose). Therefore, sugar ethyldithiocarbhydrazides with $C_V=d$ have reacted most rapidly with (+)- α -bromopropionic acid and vice versa.

2. The preparation and general chemical properties of the ethyldithiocarbhydrazide

A. Preparation

A solution of 32 g of diethyl trithiocarbonate in 200 ml of ethanol with 12 ml of 85% aqueous hydrazine hydrate gave a homogenous, yellow solution under a slight evolution of heat. After 24 hours it was allowed to evaporate freely, and slightly yellow, oily crystals were obtained as residue. When they had been dried on a porous plate, they formed 25.5 g of colourless, oblique prisms, which at 38°–39° gave a turbid suspension, which cleared at 42°. When a filtered solution of 5 g of the crude product in 50 ml of benzene was precipitated with 50 ml of light petroleum (b.p. 40°–60°), 3.9 g of transparent, oblique prisms of pure ethyldithiocarbhydrazide, m.p. 39°.5–40°.5, were obtained.

For $C_3H_8N_2S_2$ (136.23):

calc.: C 26.45,	H 5.92,	N 20.57,	S 47.07%,
found: C 26.50,	H 5.90,	N 20.61,	S 47.04%.

When the crude product was dissolved in benzene or ether, about 6% of it remained undissolved as a white crystalline powder. This melted at 155°–156° (decomp.) and was shown by analysis to be thiocarbhydrazide.

For CH_6N_4S (106.15):

calc.: N 52.79;	found: N 51.92%.
-----------------	------------------

Since the thiocarbhydrazide might have been formed by the action of remaining hydrazine on primarily formed ethyldithiocarbhydrazide, 1.2 ml of 85% aqueous hydrazine hydrate was added to a solution of 2.7 g of ethyldithiocarbhydrazide in 20 ml of ethanol. A homogenous mixture was obtained, which soon began to smell of ethanethiol and next day had separated colourless prisms. Allowed to evaporate freely, it gave 2.2 g of thiocarbhydrazide in form of a pink mass of m.p. 155°–157° (decomp.), which, after being recrystallized twice from water, yielded 1.2 g of colourless prisms, m.p. 167°–167.5 (decomp.)¹, containing:

calc.: N 52.79, S 30.20%; found: N 53.20, S 30.06%.

The ethyldithiocarbhydrazide could be prepared more easily, with less contamination and with better yield from hydrazinium dithiocarbazine, which was prepared chiefly according to CURTIUS (10) in the following way: a mixture of 60 ml of 85% aqueous hydrazine hydrate and 100 ml of ethanol was cooled with ice to +10°, after which 38 g of carbon disulphide in 100 ml of ethanol was added with stirring in several portions, in order that the temperature should not exceed +30°. Then 68 g of hydrazinium dithiocarbazine separated, m.p. 119°–120° (decomp.), containing 40.09, calc. 39.96, % N and 45.87, calc. 45.72, % S.

To a solution of 55 g of ethyl bromide in 250 ml of ethanol 400 ml of water and 70 g of powdered hydrazinium dithiocarbazine were added in small portions with stirring. After 3–4 hours all salt was dissolved, and next day the mixture was allowed to evaporate freely to about 300 ml volume. At this time transparent prisms had separated from the liquid and were sucked off and dried on a porous plate. The yield was 46.0 g of a product of m.p. 39°–40° and containing 46.90, calc. 47.07, % S. By extracting the mother liquor with 2 × 250 ml of ether, 10.5 g of a brown oil was obtained, which could not be made to crystallize. But, when 5 g of conc. sulphuric acid in 55 ml of ethanol was added, 8.0 g of the sulphate of the ethyldithiocarbhydrazide separated, m.p. 153°–154° (decomp.), described on page 307.

The crystals of ethyldithiocarbhydrazide show triboluminescence, when crushed.

When ethyldithiocarbhydrazide was heated in the water bath without solvent, in 50% aqueous ethanolic solution, in benzene, and in the equivalent amount or excess of N-NaOH or N-HCl, in all cases, hydrogen sulphide was evolved. However, except for unchanged ethyldithiocarbhydrazide, no definable products could be isolated from the reaction masses.

When the hydrazide was titrated against iodine solution with starch as indicator, extremely sliding end points were obtained. When the hydrazide was dissolved in hydrochloric acid, only a minute amount of iodine was consumed, but when it was dissolved in ethanol or in the equivalent amount of alkali, it was necessary to add 50% or greater excess of iodine. In preparative experiments, no definable products could be obtained.

B. Salts

As a hydrazine derivate, the ethyldithiocarbhydrazide is a base, though so weak, that its solution in water is coloured red by methyl red. However, it yields rather stable salts with sulphuric acid and hydrochloric acid.

To prepare the *sulphate*, 2.0 g of conc. sulphuric acid in 20 ml of ethanol was added to a solution of 5.4 g of ethyldithiocarbhydrazide in 20 ml of ethanol. The temperature rose to about 40°, and the mixture stiffened to a porridge of 6.4 g of

¹ STOLLÉ and BOWLES (11) report m.p. 168° (decomp.) for thiocarbhydrazide.

white flakes of m.p. $157^{\circ}.5$ – 158° (decomp.). By recrystallization from 40 ml of ethanol 5.3 g of thin, long prisms of m.p. 158° – $158^{\circ}.5$ (decomp.) were obtained, which according to analysis consisted of the neutral sulphate of ethyldithiocarbhydrazide.

For $C_6H_{18}O_4N_4S_5$ (370.54):

calc.: N 15.12, S 43.26%, equiv. 185.3,
found: N 15.16, S 43.29%, equiv. 185.2 (methyl red).

Attempts to prepare the acid sulphate by treating one equivalent of ethyldithiocarbhydrazide with two equivalents of sulphuric acid gave only the neutral sulphate.

The *hydrochloride* was prepared by adding 5 ml of 5 N-HCl to a solution of 3.5 g of ethyldithiocarbhydrazide in 15 ml of ethanol. After being freely evaporated, the homogenous mixture gave large, transparent plates, m.p. 131° – 132° (decomp.).

For $C_3H_9N_2S_2Cl$ (172.70):

calc.: N 16.22, S 37.13, Cl 20.53%, equiv. 172.7,
found: N 16.31, S 37.10, Cl 19.91%, equiv. 173.0 (methyl red).

Attempts to titrate the hydrochloride according to MOHR or VOLHARD gave no reasonable values, since ethyldithiocarbhydrazide reacts with both potassium chromate and silver nitrate.

As an acid, the ethyldithiocarbhydrazide is so weak, that on its titration with 0.1000 N-NaOH and phenolphthalein, a blunt end point gave the equiv. 147, calc. 136.2.

A clear solution was obtained from 5.4 g of ethyldithiocarbhydrazide and 80 ml of 0.5 N-NaOH. When portions of this solution were mixed with 0.5 N solutions of calcium chloride, strontium nitrate, barium chloride or magnesium sulphate, no precipitate was formed in any case. On the other hand, copper sulphate gave a voluminous, greygreen, amorphous powder, silver nitrate a grey-brown, faintly crystalline powder and zinc sulphate a white powder of microcrystalline, thin prisms. Mercury (II) chloride yielded yellow, brittle conglomerates, which were grey-green discoloured on the surface. Manganese sulphate yielded a small amount of grey-brown, round grains, and iron (III) chloride caused evolution of gas and an inflated, sticky, dark brown mass. Cobalt (II) chloride gave a grey-brown, voluminous, amorphous powder with sparse needles, nickel sulphate a grey-green, voluminous, amorphous powder and lead acetate a yellow, partly red-brown discoloured powder. Owing to its appearance of uniformity, the zinc salt was prepared in somewhat greater amount for analysis. From 2.7 g of ethyldithiocarbhydrazide in 100 ml of 0.2 N-NaOH and 40 ml of 0.5 N-ZnSO₄ 3.2 g of the salt was obtained, formula II, p. 2.

For $C_6H_{14}N_4S_4Zn$ (335.82):

calc.: N 16.69, S 38.19, Zn 19.47%,
found: N 16.46, S 37.49, Zn 19.53%.

C. Reactions between ethyldithiocarbhydrazide and haloid esters

When ethyldithiocarbhydrazide reacted with *methyl iodide* or *ethyl bromide* in alkaline aqueous etanolic solution, oils were obtained, which could not be made to crystallize.

When 3.0 g of *bromoacetic acid* in 22 ml of N-NaOH was added to 2.7 g of ethyldithiocarbhydrazide in 20 ml of N-NaOH, a homogenous mixture was obtained. The next day 10 ml of 5 N-HCl was added, which separated 2.8 g of white, naphthaline-

like flakes, m.p. 131° – 132° . When recrystallized from 12 ml of ethanol, the product gave 2.0 g of flakes, m.p. 132° – $132^{\circ}.5$, according to analysis consisting of 2-ethylthio-5-oxo-5,6-dihydro-1,3,4-thiapyridazine, formula III, p. 2.

For $C_5H_8ON_2S_2$ (176.25):

calc.: C 34.07,	H 4.57,	N 15.90,	S 36.38%,
found: C 34.19,	H 4.59,	N 15.91,	S 36.28%.

In a solution of 0.1640 g of this substance in 10 ml of ethanol, already three added drops of 0.1000 N-NaOH caused a pale phenolphthalein-colour. When totally 9.88 ml of alkali had been added, the solution after 24 hours was decolourized by 9.09 ml of 0.1012 N-HCl, corresponding to a hydrolysis of about 7%. In the same way after 48 hours a hydrolysis of about 13% was obtained.

When ethyldithiocarbhydrazide reacted with *chloroacetamide* in the corresponding way, the same product was obtained under liberation of ammonia.

D. Reactions between ethyldithiocarbhydrazide and thioesters

a. Ethyldithiocarbhydrazide and diethyl trithiocarbonate

When 7.2 g of ethyldithiocarbhydrazide and 8.3 g of diethyl trithiocarbonate were added to a solution of 6.0 g of potassium hydroxide in 100 ml of ethanol, a clear, yellow solution was obtained. The following day it smelt strongly of ethanethiol. When 80 ml of water had been added, it was allowed to evaporate freely, until the ethanol had completely evaporated. Traces of a separated oil were taken up in ether, and then the alkaline solution was shaken with 25 ml of 5 N-HCl and 100 ml of ether. The ethereal solution, on free evaporation, yielded a pale yellowish crust of prisms, which after one hour in vacuum over phosphorus pentoxide weighed 10.8 g and melted at 80° – 82° and showed the equiv. (phenolphthalein) 230.9, for 1,2-bis-ethyldithiocarbhydrazide, $C_6H_{12}N_2S_4$, formula IV, p. 2., calc. 240.4. As this hydrazide is too unstable to be prepared in a quite uniform state, 5.5 g of it was heated on a water bath. It melted, evolved hydrogen sulphide and ethanethiol, and lost 0.5 g in weight in the course of 15 minutes. After cooling, the partly crystallized residue was shaken in a separatory funnel with 30 ml of N-NaOH and 30 ml of ether. The ethereal solution on free evaporation yielded 3.1 g of a brownish oil, which solidified on cooling and scratching and then melted at 18° – 20° . This, on distillation at 2 mm Hg yielded 2.0 g of a colourless oil of b.p. 137° , which on cooling gave transparent plates of m.p. 21° – 22° and according to analysis consisting of 2,5-bis-ethylthio-1,3,4-thiadiazole, formula V, p. 298.

For $C_6H_{10}N_2S_3$ (206.34):

calc.: C 34.92,	H 4.89,	N 13.58,	S 46.61%,
found: C 35.10,	H 4.89,	N 13.60,	S 46.45%.

When 16 ml of 2 N-HCl was added to the alkaline extract of the decomposition product of the 1,2-bis-ethyldithiocarbhydrazide, 1.5 g of colourless prisms were obtained, with m.p. 124° – 126° . When recrystallized from 15 ml of benzene they yielded 1.3 g of colourless prisms of m.p. 126° – 127° and according to analysis consisting of 2-mercapto-5-ethylthio-1,3,4-thiadiazole, formula VI, p. 298.

For $C_4H_6N_2S_3$ (178.29):

calc.: C 26.94,	H 3.39,	N 15.71,	S 53.95%,	equiv. 178.3,
found: C 27.05,	H 3.43,	N 15.72,	S 53.90%,	equiv. 179.2 ¹
				equiv. 174.8 ²

When 1,2-bis-ethylthiocarbhydrazide decomposes at room temperature, the two thiadiazoles are formed in other proportions. When 6.0 g of 1,2-bis-ethylthiocarbhydrazide was kept in an open vessel, ethanethiol was evolved, and the substance had attained a constant weight of 5.4 g after three days. It was apparently not changed but melted at 110°–120° and yielded on separation as above 0.5 g of bis-ethylthio-thiadiazole and 4.6 g of ethylthio-mercaptothiadiazoole (crude products).

b. Ethyldithiocarbhydrazide and ethylxanthogenacetic acid

When 3.6 g of ethylxanthogenacetic acid in 20 ml of N-NaOH was added to a solution of 2.7 g of ethyldithiocarbhydrazide in 20 ml of ethanol, a clear mixture was obtained, which next day had separated a rapidly solidifying oil. The yield was 3.1 g of colourless, short, thin prisms, m.p. 88°–90°. They were dissolved in 10 ml of ethanol, and this solution was cooled in an icebox and, finally, precipitated with 10 ml of water. The yield was 2.6 g of coarse crystals, m. p. 90°–91°, consisting of 1-ethylxanthogen-2-ethyldithiocarbhydrazide, formula VII, p. 298.

For $C_6H_{12}ON_2S_3$ (224.36):

calc.: C 32.12,	H 5.39,	N 12.49,	S 42.87%,
found: C 32.21,	H 5.37,	N 12.51,	S 42.68%.

When 2.3 g of the 1-ethylxanthogen-2-ethyldithiocarbhydrazide was heated on a water bath, it melted and evolved hydrogen sulphide and gave 1.9 g of a yellow oil after 90 minutes. Then 4.0 g of this oil was dissolved in 30 ml of ether and the solution was washed with 35 ml of 0.6 N-NaOH. The ether was distilled off in a slight vacuum. At 100°–101° and 4 mm Hg 2.6 g of a faintly yellow oil was obtained as distillate. While cooled and scratched, the oil solidified to a crystalline mass, m.p. +2°–+3°, which consisted of 2-ethylthio-5-ethoxy-1,3,4-thiadiazole, formula VIII, p. 298, according to analysis.

For $C_6H_{10}ON_2S_2$ (190.28):

calc.: C 37.87,	H 5.30,	N 14.72,	S 33.70%,
found: C 37.87,	H 5.29,	N 14.66,	S 33.62%.

c. Ethyldithiocarbhydrazide and carboxymethyl dithiobenzoate

When 4.2 g of carboxymethyl dithiobenzoate, prepared according to HOLMBERG (2), in 20 ml of N-NaOH was added to 2.7 g of ethyldithiocarbhydrazide in 10 ml of ethanol, hydrogen sulphide and ethanethiol were evolved, and the mixture soon became cloudy and separated 3.1 g of colourless prisms and amorphous lumps. When this product was treated with 20 ml of N-NaOH, 1.5 g of prisms, m.p. 37°–39°, remained undissolved. They were dissolved in 2 ml of benzene and precipitated by 20 ml of light petroleum (b.p. 40°–60°). The yield was 0.8 g of colourless prisms, m.p. 40°–41°, and consisted of 2-ethylthio-5-phenyl-1,3,4-thiadiazole, formula IX, p. 3, according to analysis.

¹ NaOH, phenolphthalein, blunt end point.

² Iodine, starch, sharp end point.

For $C_{10}H_{10}N_2S_2$ (222.32):

calc.: C 54.02,	H 4.53,	N 12.60,	S 28.84%,
found: C 54.32,	H 4.60,	N 12.53,	S 28.66%.

The alkaline extract from the crude product with 10 ml of 2 N-HCl yielded 1.5 g of a white crystalline powder, m.p. 203°–208°, which, on recrystallization twice from 20 and 15 ml of ethanol, gave 1.2 g of yellow flakes, m. p. 215°–216°. According to analysis they consisted of 2-mercapto-5-phenyl-1,3,4-thiadiazole, formula X, p. 3.

For $C_8H_6N_2S_2$ (194.26):

calc.: C 49.46,	H 3.11,	N 14.42,	S 33.01%,
found: C 49.34,	H 3.12,	N 14.41,	S 32.91%.

When dissolved in dilute ethanol, 0.2408 g of this product consumed 12.40 ml of 0.1000 N-NaOH (phenolphthalein) and then 12.90 ml of 0.0997 N-I (starch). $\text{Equiv.}_{\text{calc.}} 194.3$, $\text{equiv.}_{\text{found}} 194.3$ (alkali) and 187.2 (iodine). When this substance was dissolved in dilute ethanol or in ethanol and hydrochloric acid and then directly titrated against iodine, no reasonable end points could be obtained.

When the experiment was repeated with both starting materials dissolved in ethanol, the result was essentially the same, but when N-NaOH was the solvent, the only product was 3.2 g of the mercaptophenylthiadiazole (crude product).

A solution of 1.4 g of bromoacetic acid in 10 ml of N-NaOH was added to 1.9 g of mercaptophenylthiadiazole in 10 ml of N-NaOH. A homogenous, yellow mixture was obtained, which on scratching separated 1.8 g of yellow flakes. When heated to 250°, they darkened without melting, and consisted of the sodium salt of the 2-carboxymethylthio-5-phenyl-1,3,4-thiadiazole, by analysis.

For $C_{10}H_7O_2N_2S_2Na$ (274.30):

calc.: Na 8.38%; found: Na 8.26%.

From a solution of 1.6 g of this salt in 50 ml of hot water the corresponding acid, formula XI, p. 3, was precipitated with 5 ml of 2 N-HCl. The yield was 1.4 g of crystalline powder, m.p. 185°–186°, which on recrystallization from 10 ml of ethanol gave 1.3 g of pale yellow-grey, irregular prisms, m.p. 186°–187°.

For $C_{10}H_8O_2N_2S_2$ (252.30):

calc.: C 47.60,	H 3.20,	N 11.10,	S 25.41%,	equiv. 252.3,
found: C 47.56,	H 3.18,	N 11.10,	S 25.41%,	equiv. 252.6. ¹

3. Ethyldithiocarbhydrazones

A. Aldehyde ethyldithiocarbhydrazones

a. Formaldehyde and ethyldithiocarbhydrazone

Ethyldithiocarbhydrazone was dissolved in ethanol, N-NaOH, or 2 N-HCl, and formaldehyde was added in the proportions 2: 1, 1: 1 and 1: 2. Oils were obtained, which could not be made to crystallize. When 3.0 g of 40% aqueous formaldehyde was added to 8.1 g of ethyldithiocarbhydrazone in 30 ml of ethanol, there was a slight evolution of heat and 9.0 g of a colourless oil separated. Then 1.5 g of this oil was dissolved in 7 ml of ethanol and 1.3 g of iodine in 10 ml of ethanol was added. Together with a brown oil, 0.3 g of long, brown needles separated. On recrystallization from 10 ml of ethanol the needles yielded 0.2 g of colourless needles, m.p. 77°–

¹ Phenolphthalein.

78°. When the experiment was repeated with 1.8 g of pyridinium perbromide as an oxidizing agent, 0.3 g of pale yellow needles were obtained with the same m. p. The collected products were dissolved in 1 ml of hot benzene and precipitated with 7 ml of absolute ethanol. The yield was 0.3 g of colourless needles of unchanged m.p. and the composition $C_7H_{12}N_2S_4$.¹

For $C_7H_{12}N_2S_4$ (252.43):

calc.: C 33.30,	H 4.79,	N 11.10,	S 50.80 %,
found: C 32.97,	H 4.69,	N 10.86,	S 51.41 %.

b. Acetaldehyde and ethyldithiocarbhydrazide

In the reaction between ethyldithiocarbhydrazide and acetaldehyde, an oil was obtained, which could not be made to crystallize. When this oil was oxidized with iodine, pyridinium perbromide, or iron (III) chloride, no crystalline products could be obtained.

c. Benzaldehyde ethyldithiocarbhydrazone

When 2.1 g of benzaldehyde in 20 ml of ethanol was added to 2.7 g of ethyldithiocarbhydrazide in 20 ml of ethanol, the temperature rose to about 40° and a homogenous solution was obtained, which soon separated long, yellow needles. The next day they had been transformed into 2.6 g of oblique prisms, m.p. 127°–128° (after some sintering). On recrystallization from 15 ml of ethanol they yielded 2.0 g of pale yellow prisms, m.p. 129°–129°.5. Another recrystallization from ethanol did not change the m.p.

For $C_{10}H_{12}N_2S_2$ (224.34):

calc.: C 53.53,	H 5.39,	N 12.49,	S 28.58 %,
found: C 53.67,	H 5.43,	N 12.54,	S 28.60 %.

The same product was obtained, when benzaldehyde was added to equivalent amounts of ethyldithiocarbhydrazide in 2 N-HCl or in N-NaOH after precipitation with 2 N-HCl.

The benzaldehyde ethyldithiocarbhydrazone could not be made to react with ammonia, monomethylamine or dimethylamine. However, with hydrazine, the hydrazone split off ethanethiol and yielded the monobenzaldehyde thiocarbhydrazone. At the same time some benzaldehyde was split off, and benzalazine and thio-carbhydrazide were obtained. With sufficient reaction time as well as on reaction in aqueous sodium hydroxide, the two last-mentioned products were the only ones to be observed.

When 6.0 ml of 85% aqueous hydrazine hydrate was added to a solution of 11.2 g of benzaldehyde ethyldithiocarbhydrazone in 30 ml of ethanol and 30 ml of benzene, a homogenous mixture was obtained, which after a short time smelt from ethanethiol. The solution was allowed to evaporate freely after 18 hours, until a yellow oil began to separate. Then 10 ml of 5 N-HCl was added, corresponding to the excess of hydrazine hydrate. The mixture gave a crystalline mass, which was extracted with 60 ml of hot benzene. Evaporated freely, the benzene solution yielded sticky masses, which, on being treated with 20 ml of N-NaOH, left yellow, crystalline masses undissolved. On recrystallization from 20 ml of ethanol they yielded 1.2 g of benzalazine, identified by the m.p. 92°–93°, obtained alone and also on admixture

¹ This product will be submitted to a closer investigation in connection with experiments with other methylenedithiocarbhydrazides.

with pure benzalazine. The alkaline extract gave 3.5 g of unaffected benzaldehyde ethyldithiocarbhydrazone when 10 ml of 2 N-HCl was added. In the extraction with benzene, a colourless, crystalline mass remained undissolved. It was extracted with 2×15 ml portions of boiling water, which on cooling separated 0.7 g of thiocarbhydrazone as colourless prisms, m.p. 164° – 165° (decomp.), containing 52.81, calc. 52.79, % N. After this water extraction 2.2 g of a white, crystalline powder, m.p. $182^{\circ}.5$ – $183^{\circ}.5$ (decomp.), remained undissolved. It consisted of monobenzaldehyde thiocarbhydrazone according to analysis.

For $C_8H_{10}N_4S$ (194.25):

calc.: C 49.46,	H 5.19,	N 28.85,	S 16.50 %,
found: C 49.66,	H 5.18,	N 28.89,	S 16.68 %.

GUHA and DEY (12) have tried to prepare this substance from thiocarbhydrazone and benzaldehyde, without success.

When benzaldehyde ethyldithiocarbhydrazone reacted with ethyl bromide in absolute ethanolic potassium hydroxide, no crystalline product could be obtained.

Benzyl chloride, weighing 1.3 g, was added to a solution of 2.3 g of benzaldehyde ethyldithiocarbhydrazone in 10 ml of N-NaOH and 10 ml of ethanol. An oil was obtained, which solidified after three days to 2.5 g of a crystalline mass, m.p. 70° – 74° . On recrystallization from 15 ml of ethanol it yielded 2.0 g of pale yellow flakes, m.p. 61° – 73° , which consisted of benzaldehyde S'-ethyl-S''-benzyl-isodithiocarbhydrazone, formula XII, p. 299.

For $C_{17}H_{18}N_2S_2$ (314.45):

calc.: C 64.93,	H 5.77,	N 8.91,	S 20.39 %,
found: C 64.65,	H 5.74,	N 8.90,	S 20.29 %.

BUSCH and STARKE (1), in preparing benzaldehyde S'-methyl-S''-benzyl-isodithiocarbhydrazone from benzaldehyde methyldithiocarbhydrazone and benzyl chloride in alkaline ethanolic solution, found two forms of this hydrazone with m.p. 65° and 95° – 96° respectively. They had to pick them out manually and indicated them as the syn- and antiforms of this hydrazone. It is possible, that the same circumstances are responsible here for the wide melting point range, even though the crystals in the microscope seemed to be uniform.

Bromoacetic acid, weighing 4.2 g, neutralized against 30.3 ml of N-NaOH with phenolphthalein as indicator, was added to a solution of 4.5 g of benzaldehyde ethyldithiocarbhydrazone in 25 ml of N-NaOH. A homogenous mixture was obtained, and, on the next day, 10 ml of 5 N-HCl was added. A yellow oil separated, which rapidly solidified to 5.5 g of a pale yellow, crystalline mass, m.p. 124° – 126° . Recrystallization from 25 ml of ethanol yielded 4.0 g of pale yellow, thin prisms, m.p. $125^{\circ}.5$ – $126^{\circ}.5$, and another recrystallization from 20 ml of ethanol yielded 2.7 g of prisms of m.p. 126° – 127° and consisting of benzaldehyde S'-ethyl-S''-carboxymethyl-isodithiocarbhydrazone, formula XIII, p. 299.

For $C_{12}H_{14}O_2N_2S_2$ (282.37):

calc.: C 51.04,	H 5.00,	N 9.92,	S 22.71 %,	equiv. 282.4,
found: C 50.99,	H 4.96,	N 9.97,	S 22.63 %,	equiv. 281.5. ¹

When this compound reacted with hydrazine, a doughy product was obtained, which was treated with N-NaOH. The alkaline extract, on being acidified, yielded a small amount of naphthalinelike flakes, m.p. $131^{\circ}.5$ – $132^{\circ}.5$ alone, and 132° – $132^{\circ}.5$

¹ Phenolphthalein, blunt end point.

on admixture with the 2-ethylthio-5-oxo-5,6-dihydro-1,3,4-thiapyridazine described above (p. 304).

When the benzaldehyde S'-ethyl-S''-carboxymethyl-*isodithiocarbhydrazone* was heated on a water bath with the equivalent amount or with excess of N-NaOH, no definable reaction products could be obtained.

When benzaldehyde ethyldithiocarbhydrazone was oxidized with iodine or pyridinium perbromide, the disulphide was obtained, which corresponds to the *isoform* of this hydrazone. When oxidizing with iron (III) chloride, some 2-ethylthio-5-phenyl-1,3,4-thiadiazole was also obtained.

A solution of 1.3 g of iodine in 15 ml of ethanol was added to 2.3 g of benzaldehyde ethyldithiocarbhydrazone in 10 ml of N-NaOH and 10 ml of ethanol. An emulsion resulted under a moderate evolution of heat, which separated a yellow-brown, rapidly solidifying oil. The yield was 1.9 g of a product, m.p. 130°–131°, which was dissolved in 5 ml of hot benzene, and 25 ml of hot absolute ethanol was added. On cooling, the solution separated 1.8 g of yellow, transparent plates, m. p. 132°.5–133°, which consisted of the just mentioned disulphide, formula XIV, p. 299.

For $C_{20}H_{22}N_4S_4$ (446.65):

calc.:	C 53.78,	H 4.97,	N 12.54,	S 28.71%,
found:	C 53.83,	H 4.96,	N 12.63,	S 28.48%.

The same product was obtained, when the benzaldehyde ethyldithiocarbhydrazone was oxidized with pyridinium perbromide in alkaline solution or with iodine or pyridinium perbromide in purely ethanolic solution. When the disulphide reacted with hydrazine, the same products were obtained as in the corresponding reaction with benzaldehyde ethyldithiocarbhydrazone, because of the reducing effect of the hydrazine.

When 10 ml of M-FeCl₃ was added to a solution of 2.3 g of benzaldehyde ethyldithiocarbhydrazone in 50 ml of ethanol, a homogenous, dark brown mixture was obtained, under a slight evolution of gas. The mixture rapidly solidified to a porridge, consisting of 1.0 g of yellow prisms, m.p. 124°–126°. They were treated with 10 ml of N-NaOH, and 0.1 g of grey-yellow prisms remained undissolved, m.p. 124°–128°. After recrystallization from 1 ml of benzene and 5 ml of ethanol 0.03 g of yellow plates was obtained with m.p. 131°–132° alone, and 132°–133° on admixture with pure benzaldehyde ethyl-*isodithiocarbhydrazone* disulphide. When 5 ml of 2 N-HCl was added to the alkaline extract, 0.8 g of yellow prisms were obtained, m.p. 126°–128° alone and 129°–129°.5 on admixture with pure benzaldehyde ethyldithiocarbhydrazone.

The mother liquor of the crude product on free evaporation gave 1.2 g of a crystalline mass, which on being treated with 10 ml of N-NaOH left undissolved 0.6 g of grey-brown prisms, m.p. 37°–39°. They were dissolved in 0.5 ml of benzene and on being precipitated with 5 ml of light petroleum (b.p. 40°–60°) at –20° yielded 0.3 g of pale brown prisms of m.p. 40.5–41°.5 and consisting of 2-ethylthio-5-phenyl-1,3,4-thiadiazole, formula IX, p. 3.

For $C_{10}H_{10}N_2S_2$ (222.32):

calc.:	C 54.02,	H 4.53,	N 12.60,	S 28.84%,
found:	C 54.01,	H 4.45,	N 12.67,	S 28.65%.

The alkaline extract from the product of free evaporation with 5 ml of 2 N-HCl gave 0.5 g of yellow prisms, m.p. 126°–128° alone, and 128°–129° on admixture

with pure benzaldehyde ethyldithiocarbhydrazone. The filtrate from the product of free evaporation was diluted with water to 100.0 ml. When a small amount of sulphuric acid had been added to 10.0 ml of the solution, it consumed 7.78 ml of 0.1011 N-KMnO₄. After reduction in Cd-reductor, the same volume consumed 10.36 ml of KMnO₄, which shows, that only about 75% of the added iron (III) chloride had been consumed.

d. Furfural ethyldithiocarbhydrazone

When 2.0 g of furfural was added to 2.7 g of ethyldithiocarbhydrazide in 10 ml of ethanol, a homogenous mixture was obtained. The temperature rose to about 50°, under separation till the next day of 4.2 g of short and thick, colourless prisms, m.p. 133°–134°. Recrystallization from ethanol did not change the m.p.

For C₈H₁₀ON₂S₂ (214.30):

calc.:	C 44.83,	H 4.70,	N 13.07,	S 29.92%,
found:	C 45.02,	H 4.75,	N 12.98,	S 29.91%.

A solution of 1.3 g of iodine in 10 ml of ethanol was added to 2.2 g of furfural ethyldithiocarbhydrazone in 10 ml of N-NaOH and 10 ml of ethanol. A yellow oil was obtained under a slight evolution of heat, which next day had solidified to 1.9 g of crystalline mass of m.p. 119°–122°. It was dissolved in 5 ml of hot benzene, and 50 ml of hot ethanol was added to the solution. On cooling, 1.3 g of yellow prisms was obtained, m.p. 133°–134° and consisting of furfural ethyl-*isodithiocarb*-hydrazone disulphide.

For C₁₆H₁₈O₂N₄S₄ (426.57):

calc.:	C 45.05,	H 4.25,	N 13.14,	S 30.06%,
found:	C 45.36,	H 4.30,	N 13.28,	S 29.69%.

Sticky products were obtained from furfural ethyldithiocarbhydrazone in ethanol and aqueous iron (III) chloride solution. From these products only a small amount of furfural ethyl-*isodithiocarb*hydrazone disulphide could be isolated.

B. Ketone ethyldithiocarbhydrazones

a. Acetone ethyldithiocarbhydrazone

When 24 ml of 10% aqueous acetone was added to 5.4 g of ethyldithiocarbhydrazide in 20 ml of ethanol, a homogenous mixture was obtained, which after some minutes became cloudy and under a slight evolution of heat separated a colourless, rapidly solidifying oil. Together with long needles, which also had separated from the solution, the yield was 5.0 g of m.p. 67°–70°. When 2.8 g of this product was recrystallized from 10 ml of ethanol in an icebox, 1.6 g of short prisms of m.p. 71°–73° was obtained.

For C₆H₁₂N₂S₂ (176.30):

calc.:	C 40.87,	H 6.86,	N 15.89,	S 36.37%,
found:	C 40.96,	H 6.80,	N 15.94,	S 36.26%.

When this product was oxidized in ethanolic solution with iodine or iron (III) chloride, only extremely viscous oils were obtained. However, when 1.8 g of pyridinium perbromide in 10 ml of ethanol was added to a solution of 1.8 g of acetone

ethylthiocarbhydrazone in 10 ml of ethanol, the temperature rose to about 40°, and 0.5 g of colourless, irregular prisms separated, m.p. 108°–112°.

When 1.3 g of iodine in 10 ml of ethanol was added to a solution of 1.8 g of acetone ethyldithiocarbhydrazone in 11 ml of N-NaOH, the temperature rose to about 35°, and a considerable amount of gas was evolved. The mixture became cloudy and separated a yellow-brown oil, which solidified almost immediately to 1.2 g of a crystalline mass, m.p. 86°–93°. It was recrystallized from 10 ml of ethanol and yielded 0.7 g of yellow-brown, thin prisms, m.p. 113°–115°.

When 1.8 g of pyridinium perbromide in 10 ml of ethanol was added to a solution of 1.8 g of acetone ethyldithiocarbhydrazone in 11 ml of N-NaOH, the temperature rose to about 40° and a considerable amount of gas was evolved. The mixture became cloudy and separated a yellow oil, which rapidly solidified to 1.3 g of a crystalline mass, m.p. 64°–67°. When it was treated with 10 ml of N-NaOH, 0.2 g of yellow-grey prisms remained undissolved, m.p. 111°–112° (after some sintering). The alkaline solution with 5 ml of 2 N-HCl gave a cloudy mixture, which separated 0.8 g of pale yellow prisms, m.p. 67°–68° alone and 69°–70° on admixture with pure acetone ethyldithiocarbhydrazone.

The products with m.p. between 108° and 115° were collected, and 1.2 g of the mixture, when recrystallized from 10 ml of ethanol, gave 0.8 g of pale yellow prisms, m.p. 116°–117°, consisting of acetone ethyl-*isodithiocarbhydrazone* disulphide.

For $C_{12}H_{22}N_4S_4$ (350.57):

calc.: C 41.11,	H 6.33,	N 15.98,	S 36.58%,
found: C 41.17,	H 6.39,	N 16.01,	S 36.88%.

b. Pyruvic acid ethyldithiocarbhydrazone

A solution of 9.0 g of pyruvic acid in 30 ml of water was added to a solution of 13.6 g of ethyldithiocarbhydrazone in 50 ml of 2 N-HCl. The temperature rose to about 40° and the mixture solidified to a porridge, consisting of 20.4 g of yellow flakes, m.p. 146°–146.5 (decomp). When recrystallized from 60 ml of ethanol this product gave 16.4 g of yellow flakes, m.p. 146°–146.5 (decomp.).

For $C_6H_{10}O_2N_2S_2$ (206.28):

calc.: C 34.93,	H 4.89,	N 13.58,	S 31.08%,	equiv. 103.1,
found: C 35.04,	H 4.90,	N 13.64,	S 31.01%,	equiv. 110.8. ¹

Pyruvic acid ethyldithiocarbhydrazone was oxidized with pyridinium perbromide or with iodine in an alkaline as well as in an ethanolic solution. Sticky products were obtained, from which only varying amounts of pyruvic acid ethyldithiocarbhydrazone could be recovered. The same result was obtained with iron (III) chloride in ethanolic solution.

c. Ethyl acetoacetate and ethyldithiocarbhydrazone

From 2.6 g of ethyl acetoacetate and 2.7 g of ethyldithiocarbhydrazone in 10 ml of ethanol a homogenous mixture was obtained. On being shaken with 30 ml of water it separated 3.9 g of ethyl acetoacetate ethyldithiocarbhydrazone as a green-yellow, opalescent oil, which could not be made to crystallize. When 1.4 g of it was treated with 15 ml of N-NaOH, a turbid solution was obtained,

¹ Phenolphthalein, very blunt end point.

which the next day was unchanged. With 4 ml of 5 N acetic acid it gave a cloudy mixture, which separated a colourless oil. Next day this had solidified to 0.7 g of a crystalline mass, m.p. 63°–66°. According to analysis, it consisted of a somewhat impure acetone ethyldithiocarbhydrazone, formed by ketonic hydrolysis of the ethyl acetoacetate ethyldithiocarbhydrazone.

For $C_6H_{12}N_2S_2$ (176.30):

calc.:	C 40.87,	H 6.86,	N 15.89,	S 36.37 %,
found:	C 39.57,	H 6.52,	N 16.64,	S 37.14 %.

A solution of 1.3 g of iodine in 15 ml of ethanol was added to 2.5 g of liquid ethyl acetoacetate ethyldithiocarbhydrazone in 20 ml of ethanol. A clear, brown mixture was obtained, which soon became cloudy and to the next day had separated a red, sticky product and traces of long needles. When filtered, the mixture yielded a brown-red, sticky mass on free evaporation, which was dissolved in 5 ml of benzene and precipitated with 25 ml of light petroleum (b.p. 40°–60°). A pale yellow oil separated, which soon solidified to the consistency of butter. It was dissolved in 20 ml of ethanol and 30 ml of N-NaOH was added to the solution, which remained clear to the following day. When freely evaporated, it yielded 1.0 g of yellow-white flakes, m.p. 89°–90°, which were dissolved in 2 ml of benzene and precipitated with 10 ml of light petroleum (b.p. 40°–60°). The yield was 0.9 g of colourless flakes, m.p. 90°–91°, consisting of ethyl 3-methyl-5-ethylthio-*isopyrazole*-4-carboxylate.

For $C_9H_{14}O_2N_2S$ (214.28):

calc.:	C 50.44,	H 6.59,	N 13.07,	S 14.96 %,
found:	C 50.43,	H 6.64,	N 13.16,	S 14.93 %.

A solution of 2.9 g of the just-described ester in 15 ml of ethanol and 20 ml of N-NaOH was heated on a water bath for two hours. A homogenous mixture was obtained, which was allowed to evaporate freely, until the ethanol had disappeared. It was then extracted with 25 ml of ether, and the alkaline solution was acidified with 12 ml of 2 N-HCl. The yield was 1.4 g of a white, crystalline powder, m.p. 200°–200°.5 (decomp.). When this powder was recrystallized from 10 ml of absolute ethanol, 0.9 g of colourless, irregular prisms, m.p. 203°–203°.5 (decomp.), were obtained. They consisted of 3-methyl-5-ethylthio-*isopyrazole*-4-carboxylic acid, formula XV, p. 299.

For $C_7H_{10}O_2N_2S$ (186.23):

calc.:	C 45.14,	H 5.41,	N 15.04,	S 17.22 %,	equiv. 186.2,
found:	C 45.28,	H 5.41,	N 14.88,	S 17.26 %,	equiv. 186.6. ¹

When 1.0 g of the just-described acid was kept at 202°–203°, it melted, and carbon dioxide was evolved. When the evolution of gas had stopped and after the product had been cooled, 0.8 g of a grey-brown, crystalline mass remained. It was treated with 10 ml of N-NaOH, and 0.4 g of a brown oil remained undissolved. It could not be made to crystallize and was dried in vacuum over phosphorus pentoxide. According to analysis it consisted of 3-methyl-5-ethylthio-*isopyrazole*.

For $C_8H_{10}N_2S$ (142.22):

calc.:	C 50.67,	H 7.09,	N 19.70,	S 22.54 %,
found:	C 50.56,	H 7.06,	N 19.40,	S 22.40 %.

¹ Phenolphthalein, sharp end point.

The alkaline extract from the decomposition product, when acidified, yielded 0.2 g of a white, crystalline powder, m.p. 203° – 204° alone and also on admixture with pure methyl-ethylthio-*isop*razole-carboxylic acid.

The ethyl methyl-ethylthio-*isop*razole-carboxylate may also be expected to be formed from the ethyl acetoacetate ethyldithiocarbhydrazone, by splitting off hydrogen sulphide. When the hydrazone was heated on a water bath, or on an oil bath at 130° , considerable amounts of hydrogen sulphide were evolved, but the desired product could not be isolated from the sticky reaction products.

When the ethyl acetoacetate ethyldithiocarbhydrazone was oxidized in ethanolic solution with two equivalents of iron(III)chloride, only sticky products were obtained, which could not be made to crystallize.

d. Laevulic acid ethyldithiocarbhydrazone

When 2.3 g of laevulic acid was added to 2.7 g of ethyldithiocarbhydrazone in 10 ml of ethanol, a clear, yellow solution was obtained under a weak evolution of heat. On the following day it had separated 2.9 g of colourless, almost needleshaped prisms of m.p. 116° – 117° . Using phenolphthalein as an indicator, a blunt end point gave the equiv. 122.6, calc. 117.2. When recrystallized from 8 ml of ethanol the crude product yielded 1.9 g of colourless prisms, m.p. $117^{\circ}.5$ – $118^{\circ}.5$ and equiv. 121.7, with blunt end point with phenolphthalein.

For $C_8H_{14}O_2N_2S_2$ (234.33):

calc.:	C 41.00,	H 6.02,	N 11.96,	S 27.36%,
found:	C 41.09,	H 6.02,	N 11.99,	S 27.44%.

When the laevulic acid ethyldithiocarbhydrazone was oxidized in alkaline solution with iodine, sticky products were obtained, from which only some impure starting material could be recovered. No definable products could be found on oxidation with pyridinium perbromide or with iron(III)chloride.

e. Cyclohexanone ethyldithiocarbhydrazone

When 6.0 g of cyclohexanone was added to 8.1 g of ethyldithiocarbhydrazone in 30 ml of ethanol, the temperature rose to about 40° , and a homogenous mixture was obtained. On the following day, it was seeded with crystals, obtained by scratching a drop of the solution on a watch glass. The solution separated 8.9 g of colourless prisms, m.p. 76° – 77° . When recrystallized from 10 ml of ethanol, they yielded 7.6 g of prisms, m.p. $77^{\circ}.5$ – 79° . Another recrystallization from 6 ml of ethanol gave 6.9 g of colourless prisms, m.p. 78° – 79° . The mother liquor of the crude product was freely evaporated and gave a crystalline crust, which was twice recrystallized from ethanol as above and yielded 3.6 g of colourless prisms, m.p. 78° – 79° .

For $C_9H_{16}N_2S_2$ (216.36):

calc.:	C 49.96,	H 7.45,	N 12.95,	S 29.64%,
found:	C 50.11,	H 7.43,	N 13.00,	S 29.46%.

When cyclohexanone ethyldithiocarbhydrazone was oxidized in ethanolic solution with equivalent amounts of iodine or pyridinium perbromide or with two equivalents of iron(III)chloride, only sticky products or oils were obtained, which could not be made to crystallize.

When 1.3 g of iodine in 10 ml of ethanol was added to 2.2 g of cyclohexanone ethyldithiocarbhydrazone in 10 ml of N-NaOH, a cloudy mixture was obtained under a weak evolution of heat. It separated a sticky, yellow oil, which on the following day had solidified to a crystalline mass of 1.8 g weight and m.p. 95°–98°. When recrystallized from 15 ml of ethanol, it yielded 0.5 g of irregular, yellow prisms and a dark brown, crystalline mass, which had solidified from oil. The prisms melted at 105°–107° and consisted of cyclohexanone ethyl-isodithiocarbhydrazone disulphide according to analysis:

For $C_{18}H_{30}N_4S_4$ (430.69):

calc.: C 50.19,	H 7.02,	N 13.01,	S 29.78%,
found: C 50.48,	H 7.07,	N 13.10,	S 29.80%.

The crystalline mass, which had solidified from oil, was dissolved in the hot mother liquor from the recrystallization. However, after cooling and on the following day, only traces of a dark oil had separated.

When the cyclohexanone ethyldithiocarbhydrazone was oxidized in alkaline solution with pyridinium perbromide, essentially the same result was obtained as in the foregoing experiment.

f. Camphor ethyldithiocarbhydrazone

When 3.0 g of *d*-camphor ($[\alpha]_D^{20} = +43^\circ.9$ in absolute ethanol) in 10 ml of ethanol was added to 2.7 g of ethyldithiocarbhydrazide in 10 ml of ethanol, a homogenous mixture was obtained, which remained unaltered until the following day. Then 1 ml of 2 N-HCl was added, and on the following day, a few drops of the mixture were freely evaporated on a watch glass. An oil was obtained, which crystallized on being scratched. When seeded with these crystals, the solution separated 3.5 g of transparent flakes, m.p. 114°–115°. On recrystallization from 10 ml of ethanol the yield was 3.2 g of flakes, m.p. 115°–116°. Another recrystallization from ethanol did not change the m.p.

A solution of 0.2616 g of this product in absolute ethanol, adjusted to a total volume of 9.99 ml, showed $\alpha_D^{20} = -0^\circ.86$, $[\alpha]_D^{20} = -32^\circ.8$ and $[M]_D^{20} = -88^\circ.8$. A solution of 0.4935 g of subst. in benzene, adjusted to a total volume of 9.99 ml, showed $\alpha_D^{20} = -4^\circ.40$, $[\alpha]_D^{20} = -89^\circ.1$ and $[M]_D^{20} = -241^\circ.0$.

For $C_{13}H_{22}N_2S_2$ (270.45):

calc.: C 57.73,	H 8.20,	N 10.36,	S 23.71%,
found: C 57.75,	H 8.17,	N 10.37,	S 23.83%.

A solution of 1.3 g of iodine in 10 ml of ethanol was added to a solution of 2.7 g of *d*-camphor ethyldithiocarbhydrazone in 10 ml of N-NaOH and 10 ml of ethanol. A weak evolution of heat took place, and a cloudy mixture was obtained, which separated a yellowish oil. This rapidly solidified to 2.5 g of a crystalline mass, m.p. 139°–143° (after some sintering). The product was dissolved in 6 ml of hot benzene, and 25 ml of hot ethanol was added. On cooling, 1.8 g of colour-less prisms separated, m.p. 152°–153° (prod. 1.).

A solution of 0.4620 g of subst. in benzene, adjusted to a total volume of 9.99 ml, showed $\alpha_D^{20} = -3^\circ.82$, $[\alpha]_D^{20} = -82^\circ.6$ and $[M]_D^{20} = -445^\circ.2$.

When 20 ml of M-FeCl₃ was added to a solution of 2.7 g of *d*-camphor ethyldithiocarbhydrazone in 200 ml of ethanol, a clear, brown solution was obtained,

without any considerable evolution of heat. On the following day, a voluminous precipitate of 2.1 g of colourless prisms had separated, m.p. 153° – 154° alone (prod. 2.) and $152^{\circ}.5$ – $153^{\circ}.5$ on admixture with prod. 1. In the same way as was described for benzaldehyde ethyldithiocarbhydrazone, it could be shown, that about 50% of the added iron(III)chloride had been consumed, which corresponds to the formation of *d*-camphor ethyl-*isodithiocarbhydrazone* disulphide.

For $C_{26}H_{42}N_4S_4$ (538.87):

calc.:	C 57.95,	H 7.86,	N 10.40,	S 23.80%,
found:	C 58.00 ¹ ,	H 7.77 ¹ ,	N 10.43 ² ,	S 23.72 ² %,

g. Acetophenone ethyldithiocarbhydrazone

When 7.2 g of acetophenone was added to 8.2 g of ethyldithiocarbhydrazone in 30 ml of ethanol, a homogenous mixture was obtained. After a few minutes the temperature rose to about 40° and yellow needles began to separate. On the following day, the precipitate consisted of 12.7 g of yellow needles, m.p. 126° – 127° , which, when recrystallized from 110 ml of ethanol, yielded 11.8 g of yellow needles, m.p. 130° – 131° .

For $C_{11}H_{14}N_2S_2$ (238.36):

calc.:	C 55.42,	H 5.92,	N 11.75,	S 26.90%,
found:	C 55.29,	H 5.92,	N 11.82,	S 26.76%.

When 1.3 g of iodine in 10 ml of ethanol was added to a solution of 2.4 g of acetophenone ethyldithiocarbhydrazone in 10 ml of N-NaOH and 20 ml of ethanol, a cloudy mixture was obtained under a weak evolution of heat. It separated an oil, which solidified to 2.1 g of a crystal mass, m.p. 107° – 115° . On being treated with 10 ml of N-NaOH, the mass left 1.8 g of crystals undissolved, m.p. 115° – 123° . They were dissolved in 5 ml of hot benzene, and 25 ml of hot ethanol was added. On cooling and by the following day, 1.6 g of yellow flakes or thin prisms separated, m.p. 125° – 126° , consisting of acetophenone ethyl-*isodithiocarbhydrazone* disulphide.

For $C_{22}H_{26}N_4S_4$ (474.70):

calc.:	C 55.66,	H 5.52,	N 11.80,	S 27.02%,
found:	C 55.80,	H 5.53,	N 11.83,	S 27.14%.

The alkaline extract of the oxidation product, when acidified, separated 0.2 g of a pale yellow, crystalline powder, m.p. 126° – 128° alone and $127^{\circ}.5$ – 129° on admixture with pure acetophenone ethyldithiocarbhydrazone.

When the acetophenone ethyldithiocarbhydrazone was oxidized in ethanolic solution with two equivalents of iron(III)chloride, no definable products could be obtained.

4. Ethyldithiocarbhydrazides of monosaccharides

A. *l*-Arabinose ethyldithiocarbhydrazone

To a solution of 3.0 g of *l*-arabinose in 20 ml of water after 24 hours³ 2.7 g of ethyldithiocarbhydrazone in 20 ml of ethanol was added. A clear, colourless mixture was obtained, which after *t* minutes at 20° showed the following rotations:

¹ prod. 1. ² prod. 2. ³ As also by the following sugars.

t :	3	5	10	20	45	100	180	300
α_D^{20} :	+6°.29	+6°.07	+5°.71	+4°.99	+3°.54	+1°.27	+0°.32	—0°.03
t :	600	1440	1680					
α_D^{20} :	—0°.16	—0°.23	—0°.23.					

On free evaporation the mixture yielded a yellow-green gum, which in vacuum over phosphorus pentoxide yielded 5.4 g of a brittle, yellow-green glass. It was dissolved in 15 ml of hot absolute ethanol and, on cooling, gave 4.0 g of colourless needles, m.p. 132°–133° (decomp.). When they were recrystallized from 25 ml of absolute ethanol, the yield was 2.4 g of colourless, hygroscopic needles, m.p. 134°–135° (decomp.).

For $C_8H_{16}O_4N_2S_2$ (268.35):

calc.:	C 35.80,	H 6.01,	N 10.44,	S 23.89%,
found:	C 35.78,	H 6.01,	N 10.48,	S 23.64%.

A solution of 0.6262 g of subst. in pyridine, adjusted to a total volume of 9.99 ml, showed $\alpha_D^{20} = +1°.05$, $[\alpha]_D^{20} = +16°.8$ and $[M]_D^{20} = +45°.0$ immediately and after two hours.

When 10 ml of 2 M-FeCl₃ was added to a solution of 0.01 moles of *l*-arabinose ethyldithiocarbhydrazide in 20 ml of 50% aqueous ethanol, 2.2 g of a sticky mass was obtained. When recrystallized from 10 ml of ethanol, it yielded a jelly, which soon disappeared. A white crystalline powder, weighing 0.5 g, remained, m.p. 150°–151° (after some sintering).

When 3.0 g of *l*-arabinose in 20 ml of water reacted with 2.7 g of ethyldithiocarbhydrazide in 20 ml of N-HCl, a milky mixture was obtained, to which after 24 hours 20 ml of 2 M-FeCl₃ was added. A sticky mass of 3.0 g was obtained, which, when recrystallized from 10 ml of ethanol, gave 1.5 g of a pale brown crystalline powder, m.p. 140°–142° (after some sintering).

The previous experiment was repeated, but 20 ml of N-NaOH was added to the mixture before the iron(III)chloride. A product of 2.1 g was obtained, which, when recrystallized from 15 ml of ethanol, yielded 0.9 g of a pale brown, crystalline powder, m.p. 150°.5–151°.5.

A solution of 1.5 g of *l*-arabinose in 10 ml of water with 1.4 g of ethyldithiocarbhydrazide in 10 ml of N-NaOH gave a dark brown mixture. A drop of it immediately caused a turbidity in 2 N acetic acid, but not when the test was repeated on the following day. Then 10 ml of 2 M-FeCl₃ was added, which caused the separation of a product weighing 1.4 g. It was recrystallized from 10 ml of ethanol, and yielded 0.4 g of a grey crystalline mass, m.p. 143°–145°.

The oxidation products obtained in the preceding experiments were collected and recrystallized from ethanol. Pale brown needles were recovered, m.p. 152°–153°. When recrystallized from ethanol after being treated with Norite, they yielded colourless, needleshaped prisms with m.p. 153°–153°.5, and consisting of 2-*l*-arabino-tetrahydroxybutyl-5-ethylthio-1,3,4-thiadiazole.

For $C_8H_{14}O_4N_2S_2$ (266.33):

calc.:	C 36.08,	H 5.30,	N 10.52,	S 24.08%,
found:	C 35.97,	H 5.32,	N 10.47,	S 23.88%.

A solution of 0.3998 g of subst. in pyridine, adjusted to a total volume of 9.99 ml, showed immediately, after two hours and on the following day $\alpha_D^{20} = +1°.46$, $[\alpha]_D^{20} = +36°.5$ and $[M]_D^{20} = +97°.2$.

A solution of 2.7 g of ethyldithiocarbhydrazide in 20 ml of N-NaOH was added to a solution of 3.0 g of *l*-arabinose in 20 ml of water. On the following day, 2.8 g of bromoacetic acid was neutralized with phenolphthalein against 20.5 ml of N-NaOH and added to the solution. By the next day, the mixture with 5 ml of 5 N-HCl gave 2.7 g of colourless naphthalinelike flakes, m.p. 131°.5–132°.5 and containing 36.21% S. The calculated value is 36.38% S for 2-ethylthio-5-oxo-5,6-dihydro-1,3,4-thiapyridazine. The filtrate was neutralized with 8 ml of N-NaOH, phenolphthalein as an indicator, and evaporated on a water bath to about 20 ml volume. Then 3.0 g of thiobenzhydrazide, prepared according to HOLMBERG (2), in 10 ml of ethanol was added to the solution. By the following day 3.3 g of *l*-arabinose thiobenzhydrazide had separated as colourless needles, m. p. 166°–167° (decomp.).

For $C_{12}H_{16}O_4N_2S$ (284.32):

calc.:	C 50.69,	H 5.67,	N 9.85,	S 11.28%,
found:	C 50.60,	H 5.64,	N 9.86,	S 11.27%.

A solution of 0.5288 g of sbst. in pyridine, adjusted to a total volume of 9.99 ml, showed immediately, after two hours and on the following day $\alpha_D^{20} = -1^\circ.88$ and $[\alpha]_D^{20} = -35^\circ.5$. For the same hydrazide HOLMBERG (8) reports m.p. 167°–168° (decomp.) and $[\alpha]_D^{20} = -37^\circ.2$.

A solution was prepared from 3.0 g of *l*-arabinose and 2.7 g of ethyldithiocarbhydrazide in 20 ml of N-NaOH. On the next day 3.1 g of *d,l*- α -bromopropionic acid was neutralized with phenolphthalein against 20.1 ml of N-NaOH and added to the solution. On the following day the still clear, red mixture gave an oil on the addition of 5 ml of 5 N-HCl, which solidified to 2.7 g of a sticky, brown-yellow, crystalline mass. When recrystallized from 5 ml of ethanol, it yielded 1.1 g of colourless prisms, m.p. 82°–82°.5 (prod. 1.). When the experiment was repeated with 6.2 g of *d,l*- α -bromopropionic acid in 40.3 ml of N-NaOH, 2.3 g of a crystalline mass was obtained after acidifying with 15 ml of 5 N-HCl. It was recrystallized from 5 ml of ethanol and yielded 0.7 g of colourless prisms, m.p. 82°.5–83°, (prod. 2). Both products consisted of 2-ethylthio-6-methyl-5-oxo-5,6-dihydro-1,3,4-thiapyridazine, formula XVII, p. 300.

For $C_8H_{10}ON_2S_2$ (190.28):

calc.:	C 37.87,	H 5.30,	N 14.72,	S 33.70%,
found:	C 37.86 ¹ ,	H 5.24 ¹ ,	N 14.70 ² ,	S 33.72 ² %.

Prod. 1: A solution of 0.4697 g of sbst. in absolute ethanol, adjusted to 9.99 ml, showed $\alpha_D^{20} = +0^\circ.03$ and $[\alpha]_D^{20} = +0^\circ.6$.

Prod. 2: A solution of 0.5876 g of sbst. in absolute ethanol, adjusted to 9.99 ml, showed $\alpha_D^{21} = +0^\circ.05$ and $[\alpha]_D^{21} = +0^\circ.9$.

In order to transform the bromopropionic acid, which remained in the filtrate from the crude product 2, into dithiodilactic acids, this was extracted with 3×100 ml of ether. The ethereal portions were neutralized with $18.4 + 1.6 + 0.4 = 20.0$ ml of N-NaOH, phenolphthalein as an indicator. This now neutral solution gave a cloudy mixture on the addition of 6 ml of 5 N-HCl, which separated a small amount of brown oil. The solution was decanted and extracted with 2×25 ml of ether, which consumed $16.2 + 1.0 = 17.2$ ml of N-NaOH. Solid potassium xanthate, weighing 2.8 g, was added to this neutral solution. A clear solution was obtained, to which on the next day 11 ml of conc. ammonia was added. A homogenous mixture was

¹ prod. 1. ² prod. 2.

obtained, which on the following day was allowed to evaporate freely and separated great, transparent plates of O-ethylxanthogenamide. They were filtered off and the solution was extracted with 25 ml of ether. A drop of 10% aqueous iron(III)-chloride was added to the water solution, which became purple. However, the colour faded after 5 days in an open vessel. A small amount of colourless, viscous oil separated, when 10 ml of 5 N-HCl was added, and it was filtered off. The mixture was extracted with 3×30 ml of ether, which was allowed to evaporate freely. The yield was 1.5 g of colourless crystals, which were dissolved in 10 ml of water. The solution was freely evaporated to almost complete dryness, and the rest was dried on a porous plate. The yield was 0.4 g of dithiodilactic acids, m.p. about 100° – 125° and equiv. 108.3, calc. 105.1. A solution of 0.3695 g of subst. in water, adjusted to 9.99 ml, showed $\alpha_D^{21} = +0^{\circ}.09$ and $[\alpha]_D^{21} = +2^{\circ}.4$.

B. *d*-Xylose ethyldithiocarbhydrazide

After 24 hours 2.7 g of ethyldithiocarbhydrazide in 20 ml of ethanol was added to a solution of 3.0 g of *d*-xylose in 20 ml of water. A clear, colourless mixture was obtained, which after *t* minutes at 19° showed the following rotations:

<i>t</i> :	3	7	30	70	90	150	360	720	1500
α_D^{19} :	$+1^{\circ}.40$	$+1^{\circ}.38$	$+1^{\circ}.18$	$+0^{\circ}.17$	$-0^{\circ}.44$	$-2^{\circ}.29$	$-4^{\circ}.18$	$-4^{\circ}.57$	$-4^{\circ}.64$
<i>t</i> :	1800								
α_D^{19} :	$-4^{\circ}.64$.								

The mixture was then allowed to evaporate freely and yielded a yellow-green gum. It could not be made to crystallize, but gave 5.4 g of a brittle glass in vacuum over phosphorus pentoxide.

A solution of 3.0 g of *d*-xylose in 20 ml of water was mixed after 24 hours with 2.7 g of ethyldithiocarbhydrazide in 20 ml of N-HCl. An opalescent mixture was obtained, which was treated with Norite and then at $19^{\circ}.5$ showed:

<i>t</i> :	5	7	8	10	15	25	30	45
$\alpha_D^{19.5}$:	$-2^{\circ}.26$	$-3^{\circ}.10$	$-3^{\circ}.69$	$-4^{\circ}.24$	$-5^{\circ}.26$	$-5^{\circ}.96$	$-6^{\circ}.18$	$-6^{\circ}.58$.

Then further measurements became impossible because of an increasing opalescence. On the following day the mixture yielded only some dark oil on the addition of 20 ml of 2 M-FeCl₃. The same result was obtained, when *d*-xylose ethyldithiocarbhydrazide was oxidized in ethanolic or in alkaline solution with iron(III)chloride.

From 2.7 g of ethyldithiocarbhydrazide in 20 ml of N-NaOH and 3.0 g of solid *d*-xylose an opalescent mixture was obtained. When on the next day 3.1 (1) or 6.2 (2) g of *d,l*- α -bromopropionic acid in the equivalent amount of N-NaOH were added to such solutions, the following results were obtained:

1: 1.6 g of 2-ethylthio-6-methyl-5-oxo-5,6-dihydro-1,3,4-thiapyridazine, m.p. 82° .5– 83° , contained 33.71, calc. 33.70, % S and showed $[\alpha]_D^{21} = +0^{\circ}.8$ in absolute ethanol.

2: 0.9 g of thiapyridazine, m.p. 82° – 83° , contained 14.70, calc. 14.72, % N and showed $[\alpha]_D^{20} = +0^{\circ}.6$ in absolute ethanol, and 0.7 g of dithiodilactic acids, m.p. about 100° – 135° , showed the equiv. 107.2, calc. 105.1, and $[\alpha]_D^{20} = +2^{\circ}.0$ in water.

C. *d*-Glucose ethyldithiocarbhydrazide

After 24 hours 2.8 g of ethyldithiocarbhydrazide in 20 ml of ethanol was added to a solution of 3.6 g of *d*-glucose in 20 ml of water. A clear, colourless mixture was obtained, which at 20° showed:

<i>t</i> :	5	20	40	120	360	662	1440	1620
α_D^{20} :	+4°.37	+4°.32	+4°.09	+3°.06	+1°.56	+0°.83	+0°.43	+0°.43.

In a corresponding experiment, 5.4 g of ethyldithiocarbhydrazide in 30 ml of ethanol was added to a solution of 7.2 g of *d*-glucose in 30 ml of water. On the following day the mixture was evaporated in vacuum over conc. sulphuric acid. Next day it had solidified to a porridge, consisting of 8 g of colourless needles, which gave an opaque liquid at 84°–86° in an open tube and at 85°–87° in a closed one. In vacuum over phosphorus pentoxide the product lost 6.15% in weight, and then in a closed tube at 85°–90° gave an opaque liquid. Analysis then gave the following result:

For $C_9H_{18}O_5N_2S_2$ (298.37):

calc.:	C 36.23,	H 6.08,	N 9.39,	S 21.49 %.
found:	C 35.53,	H 5.94,	N 9.69,	S 22.19 %.

A solution of 0.6416 g of the dried product in pyridine, adjusted to a total volume of 9.99 ml, showed immediately and after 2 hours $\alpha_D^{20} = +1°.26$, $[\alpha]_D^{20} = +19°.6$ and $[M]_D^{20} = +58°.5$.

When 4.5 g of the crude product was recrystallized from 10 ml of water, 2.4 g of colourless, needleshaped prisms were obtained, which at about 80°–90° gave an opaque liquid in an open tube similar to that found in a closed one. It lost 4.57% of its weight in vacuum over phosphorus pentoxide. According to analysis it then contained C 35.10, H 5.94, N 10.58 and S 24.06% and showed $[\alpha]_D^{20} = +19°.1$ in pyridine.

When *d*-glucose ethyldithiocarbhydrazide was oxidized in aqueous ethanolic solution, in 0.5 N-HCl, or in 0.5 N-NaOH with iron(III)chloride, no definable products could be obtained.

A solution of 1.5 g of bromoacetic acid in the equivalent amount of N-NaOH was added to a solution of 3.0 g of *d*-glucose ethyldithiocarbhydrazide in 10 ml of N-NaOH. On the next day, on acidifying, the mixture separated 0.5 g of 2-ethylthio-5-oxo-5,6-dihydro-1,3,4-thiapyridazine, m.p. 131°.5–132°. The filtrate, on the addition of 1.5 g of thiobenzhydrazide in 10 ml of ethanol, yielded 0.7 g of narrow, colourless prisms, m.p. 179°–180°¹ (decomp.). They contained 10.30% S, the calculated value for glucose thiobenzhydrazide being 10.20% S. The same result was obtained, when the product, which had been recrystallized from water, reacted with bromoacetate.

From 2.7 g of ethyldithiocarbhydrazide in 20 ml of N-NaOH and 3.6 g of solid *d*-glucose an opalescent mixture was obtained. When on the next day 3.1 (1) or 6.2 (2) g of *d,l*- α -bromopropionic acid in the equivalent amount of N-NaOH were added to such solutions, the following results were obtained:

- 1: 0.7 g of 2-ethylthio-6-methyl-5-oxo-5,6-dihydro-1,3,4-thiapyridazine, m.p. 82°–82°.5, contained 14.72, calc. 14.72, % N and showed $[\alpha]_D^{20} = +8°.5$ in absolute ethanol.
- 2: 0.3 g of thiapyridazine, m.p. 82°–83°, contained 33.82, calc. 33.70, % S and showed $[\alpha]_D^{20} = +5°.8$ in absolute ethanol, and 0.6 g of dithiodilactic acids, m.p. about 100°–135°, showed equiv. 107.1, calc. 105.1, and $[\alpha]_D^{20} = +2°.1$ in water.

¹ HOLMBERG (8) reports 183°–184°.

D. *d*-Mannose ethyldithiocarbhydrazide

After 24 hours 2.8 g of ethyldithiocarbhydrazide in 20 ml of ethanol was added to a solution of 3.6 g of *d*-mannose in 20 ml of water. A clear, colourless mixture was obtained, which after *t* minutes at 20° showed the following rotations:

<i>t</i> :	3	10	15	30	60	120	240	360	1360
α_D^{20} :	+1°15	+0°81	+0°52	—0°24	—1°24	—2°23	—2°82	—2°92	—2°92.

On free evaporation the mixture separated 5.0 g of a white crystalline powder, m.p. 136°–138° (opaque, decomp. at 139°).

For $C_9H_{18}O_5N_2S_2$ (298.37):

calc.:	C 36.23,	H 6.08,	N 9.39,	S 21.49%,
found:	C 36.04,	H 5.98,	N 9.69,	S 21.97%.

As the product is slightly soluble in pyridine, absolute ethanol and water, its rotation was determined in a mixture of equal volumes of water and absolute ethanol. A solution of 0.6081 g of the subst. in this mixture, adjusted to a total volume of 9.99 ml, showed at 20°:

<i>t</i> :	5	10	20	40	80	160	1300
α_D^{20} :	—0°53	—0°61	—0°69	—0°77	—0°83	—0°87	—0°87,

which gives $[\alpha]_D^{20}$ = about -7° (extrapol.) $\rightarrow -14.3$ and $[\eta]_D^{20}$ = about $-21^\circ \rightarrow -42.6$.

Attempts to recrystallize the crude product from absolute ethanol or water gave only products with lower melting points.

After 24 hours 2.8 g of ethyldithiocarbhydrazide in 20 ml of N-HCl was added to a solution of 3.6 g of *d*-mannose in 20 ml of water. An opalescent mixture was obtained, which was treated with Norite and then at 20° showed:

<i>t</i> :	5	10	30	60	120
α_D^{20} :	+1°15	+1°49	+1°73	+1°77	+1°77.

When 4 g of crystallized sodium acetate in 5 ml of water was added, the mixture separated a paraffin-like mass, which was sucked off and air-dried. It weighed 4.3 g and melted at 116°–120° (decomp.).

After 24 hours 2.8 g of ethyldithiocarbhydrazide in 20 ml of N-NaOH was added to a solution of 3.6 g of *d*-mannose in 20 ml of water. A clear solution was obtained, which gradually turned yellow and after *t* minutes at 20°.5 showed:

$t:$	3	8	15	30	60	120	240	450	1300
$\alpha_{\text{D}}^{20.5}:$	+1°13	+1°22	+1°38	+1°71	+2°33	+3°21	+4°06	+4°62	+4°74
$t:$	1700	2700							
$\alpha_{\text{D}}^{20.5}:$	+4°74	+4°75							

This mixture then gave 3.0 g of pale brown crystals, m.p. 125°–133° (decomp.) on the addition of 15 ml of 2 N acetic acid.

When the *d*-mannose ethyldithiocarbhydrazide was oxidized in aqueous ethanolic solution, in 0.5 N-HCl, or in 0.5 N-NaOH with iron(III)chloride, no definable products were obtained.

Solid *d*-mannose, weighing 3.6 g, was dissolved in a solution of 2.7 g of ethyldithiocarbhydrazide in 20 ml of N-NaOH. On the next day, 2.0 g of chloroacetamide in 20 ml of hot ethanol was added. During the following day, the homogenous,

brown mixture was allowed to evaporate freely and gave a purple mass along with crystals of sodium chloride. This mass in vacuum over phosphorus pentoxide gave a brittle, purple, inflated glass, weighing 8.5 g. The product was treated with 40 ml of hot absolute ethanol and the undissolved sodium chloride was filtered off. On cooling, after seeding with a crystalline sample, 4.4 g of colourless flakes or plates separated, m.p. 155°–156°, consisting of *d*-mannose *S*'-ethyl-*S*''-carbamoylmethylisodithiocarbhydrazide, formula XVI, p. 300.

For $C_{11}H_{21}O_6N_3S_2$ (355.42):

calc.:	C 37.17,	H 5.96,	N 11.82,	S 18.04%,
found:	C 37.44,	H 6.00,	N 11.79,	S 18.06%.

A solution of 0.5232 g of this product in pyridine, adjusted to a total volume of 9.99 ml, showed immediately, after one and after three days $\alpha_D^{20} = +4^\circ.68$, $[\alpha]_D^{20} = +89^\circ.4$ and $[M]_D^{20} = +317^\circ.9$.

From 2.7 g of ethyldithiocarbhydrazide in 20 ml of *N*-NaOH and 3.6 g of solid *d*-mannose a clear mixture was obtained. When on the next day 3.1 (1) or 6.2 (2) g of *d,l*- α -bromopropionic acid in the equivalent amount of *N*-NaOH were added to such solutions, the following results were obtained:

1: 1.9 g of 2-ethylthio-6-methyl-5-oxo-5,6-dihydro-1,3,4-thiapyridazine, m.p. 82°–82°5, contained 14.70, calc. 14.72, % N and showed $[\alpha]_D^{20} = -0^\circ.6$ in absolute ethanol.

2: 1.6 g of thiapyridazine, m.p. 82°–82°5, contained 33.58, calc. 33.70, % S and showed $[\alpha]_D^{20} = -0^\circ.6$ in absolute ethanol, and 0.8 g of dithiodilactic acids, m.p. 100°–130°, showed equiv. 106.2, calc. 105.1, and $[\alpha]_D^{20} = +3^\circ.9$ in water.

E. *d*-Galactose ethyldithiocarbhydrazide

After 24 hours 2.8 g of ethyldithiocarbhydrazide in 20 ml of ethanol was added to a solution of 3.6 g of *d*-galactose in 20 ml of water. A clear mixture was obtained, which after *t* minutes at 20° showed the following rotations:

<i>t</i> :	3	10	30	60	120	210	630	1440	4320
α_D^{20} :	+5°75	+5°60	+5°21	+4°69	+3°80	+2°79	+1°19	+0°84	+0°74
<i>t</i> :	5880								
α_D^{20} :	+0°74.								

On free evaporation, the mixture separated 4.4 g of colourless flakes, m.p. 127°–129° (opaque, brown liquid). When recrystallized from 40 ml of absolute ethanol, 3.0 g of the product gave 1.8 g of colourless flakes, m.p. 131°–132°.

For $C_9H_{18}O_5N_2S_2$ (298.37):

calc.:	C 36.23,	H 6.08,	N 9.39,	S 21.49%,
found:	C 36.31,	H 6.08,	N 9.28,	S 21.49%.

A solution of 0.4383 g of the subst. in pyridine, adjusted to a total volume of 9.99 ml, showed immediately $\alpha_D^{20} = +0^\circ.74$ but after two hours and on the following day $\alpha_D^{20} = +0^\circ.87$, $[\alpha]_D^{20} = +19^\circ.8$ and $[M]_D^{20} = +59^\circ.2$.

In another experiment, the reaction mixture gave a yellow gum on free evaporation, which was dissolved in 20 ml of water. The addition of 20 ml of 2 *M*-FeCl₃ caused a considerable evolution of gas, and a sticky mass separated. This was dried on a

porous plate and weighed 6.3 g. When recrystallized twice from 40 ml and 45 ml of ethanol, the product gave 1.8 g of colourless, thin prisms, m.p. 185°–186°.

After 24 hours 2.8 g of ethyldithiocarbhydrazide in 20 ml of N-HCl was added to a solution of 3.6 g of *d*-galactose in 20 ml of water. A milky mixture was obtained, which was treated with Norite and then showed at 20°:

<i>t</i> :	5	7	10	20	30	60
α_D^{20} :	+4°.33	+3°.60	+2°.70	+1°.25	+0°.87	+0°.74.

After 60 minutes an increasing opalescence made further measurements impossible. On the addition of 4 g of crystallized sodium acetate in 5 ml of water and 20 ml of 2 M-FeCl₃, a sticky mass separated, which weighed 4.5 g and on recrystallization from ethanol gave 1.6 g of thin, colour-less prisms, m.p. 184°–184°.5. The same result was obtained without the addition of sodium acetate.

After 24 hours 2.7 g of ethyldithiocarbhydrazide in 20 ml of N-NaOH was added to a solution of 3.6 g of *d*-galactose in 20 ml of water. A yellow-brown mixture was obtained, which showed at 20°.5:

<i>t</i> :	4	10	30	60	120	300	550	1440
$\alpha_D^{20.5}$:	+6°.15	+5°.89	+5°.55	+5°.52	+5°.78	+6°.34	+6°.58	+6°.74

t: 4230
 $\alpha_D^{20.5}$: about +6°.7 (opalescent solution).

Then, 15 ml of 2 N acetic acid and 20 ml of 2 M-FeCl₃ were added and 3.0 g of a dark brown mass separated, which was recrystallized from ethanol and gave 1.0 g of thin, colourless prisms, m.p. 184°–185°. When the experiment was repeated without the addition of the acetic acid, the result was the same.

The products of m.p. 184°–186°, obtained in the preceding experiments, were collected, and 6.0 g of it was recrystallized from 190 ml of ethanol. The yield was 5.2 g of thin, colourless prisms, m.p. 185°.5–186°, which consisted of 2-*d*-galactopentahydroxymethyl-5-ethylthio-1,3,4-thiadiazole.

For C₉H₁₆O₅N₂S₂ (296.36):

calc.:	C 36.47,	H 5.44,	N 9.45,	S 21.64%,
found:	C 36.39,	H 5.35,	N 9.45,	S 21.59%.

A solution of 0.5113 g of the subst. in pyridine, adjusted to a total volume of 9.99 ml, showed immediately, after 5 hours and on the next day $\alpha_D^{21} = +1°.32$, $[\alpha]_D^{21} = +25°.8$ and $[M]_D^{21} = +76°.5$.

From 2.7 g of ethyldithiocarbhydrazide in 20 ml of N-NaOH and 3.6 g of solid *d*-galactose a clear mixture was obtained. When on the next day 3.1 (1) or 6.2 (2) g of *d,l*- α -bromopropionic acid in the equivalent amount of N-NaOH were added to such solutions, the following results were obtained:

1: 1.5 g of 2-ethylthio-6-methyl-5-oxo-5,6-dihydro-1,3,4-thiapyridazine, m.p. 82°.5–83°, contained 14.81, calc. 14.72, % N and showed $[\alpha]_D^{20} = +2°.6$ in absolute ethanol and $[\alpha]_D^{20} = +2°.0$ in pyridine.

2: 0.8 g of thiapyridazine, m.p. 82°–83°, contained 33.60, calc. 33.70, % S and showed $[\alpha]_D^{20} = +6°.6$ in absolute ethanol, and 1.0 g of dithiodilactic acids, m.p. about 100°–130°, showed equiv. 108.4, calc. 105.1, and $[\alpha]_D^{20} = +4°.9$ in water.

F. *d*-Fructose ethyldithiocarbhydrazide

After 24 hours 2.7 g of ethyldithiocarbhydrazide in 20 ml of N-NaOH was added to a solution of 3.6 g of *d*-fructose in 20 ml of water. A clear, yellow mixture was obtained, which showed at 20°:

<i>t</i> :	4	60	150	270	610	1440	2840	5760
α_D^{20} :	-7°.28	-7°.18	-6°.92	-6°.70	-6°.31	-5°.82	-5°.52	-5°.22
<i>t</i> :	12880	20160						
α_D^{20} :	-4°.68	about -4°.2	(dark solution).					

When 15 ml of 2 N acetic acid and then 20 ml of 2 M-FeCl₃ was added to the solution, only a dark brown oil was obtained.

When 3.6 g of *d*-fructose in 20 ml of water was added to 2.7 g of ethyldithiocarbhydrazide in 20 ml of ethanol, a clear mixture was obtained, which after three weeks was unchanged. It was allowed to evaporate freely until the ethanol had disappeared. A yellow oil separated, which was seeded with ethyldithiocarbhydrazide and then partly crystallized. The oil was removed and the solution extracted with ether, which was freely evaporated. It yielded together with the removed product 2.1 g of an oil. The oil with benzaldehyde in ethanol gave 2.8 g of pale yellow prisms, m.p. 126°-127° alone and 128°-129° on admixture with pure benzaldehyde ethyldithiocarbhydrazide.

From 2.7 g of ethyldithiocarbhydrazide and 3.6 g of *d*-fructose in 40 ml of 0.5 N-HCl the same result was obtained.

From 2.7 g of ethyldithiocarbhydrazide in 20 ml of N-NaOH and 3.6 g of solid *d*-fructose a clear mixture was obtained. When after four days 3.1 (1) or 6.2 (2) g of *d,l*- α -bromopropionic acid in the equivalent amount of N-NaOH were added to such solutions, the following results were obtained:

1: 1.2 g of 2-ethylthio-6-methyl-5-oxo-5,6-dihydro-1,3,4-thiapyridazine, m.p. 83°-83°.5, contained 33.68, calc. 33.70, % S and showed $[\alpha]_D^{20} = +0°.5$ in absolute ethanol.

2: 0.8 g of thiapyridazine, m.p. 83°-83°.5, contained 14.80, calc. 14.72, % N and showed $[\alpha]_D^{20} = +0°.6$ in absolute ethanol, and 0.4 g of dithiodilactic acids, m.p. about 100°-120°, showed equiv. 109.9, calc. 105.1, and $[\alpha]_D^{20} = -1°.6$ in water.

REFERENCES: 1. M. Busch und M. Starke: J. prakt. Chem (2) 93 59, 67 (1916). — 2. B. Holmberg: Arkiv Kemi, Mineral., Geol. 17 A. N:o 23 (1944). — 3. B. Holmberg: Arkiv Kemi, Mineral., Geol. 25 A. N:o 18 (1947). — 4. J. Wangel: Arkiv för Kemi, I. Nr 51 (1949). — 5. G. Young and W. Eyre: J. Chem. Soc. 79 57 (1901). — 6. E. Fromm: Ann. 447 296, 303 (1926). — 7. E. Hoggarth: J. Chem. Soc. 1949 1163. — 8. B. Holmberg: Arkiv för Kemi, 4 Nr 5 (1952). — 9. A. D. Mitchell: British Chemical Nomenclature, London 1948, p. 95. — 10. Th. Curtius: J. prakt. Chem (2) 52 486 (1895). — 11. R. Stollé und P. E. Bowles: Ber. 41 1099 (1908). — 12. P. C. Guha and S. C. Dey: Quart. J. Indian Chem. Soc. 2 227 (1925).

Nobel Institute of the Royal Swedish Academy of Sciences, Department for Organic Chemistry, Stockholm 50.

Tryckt den 3 juni 1952

Uppsala 1952. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

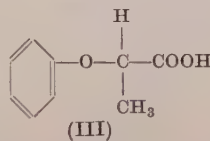
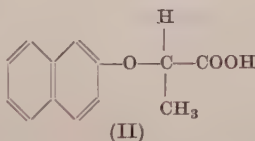
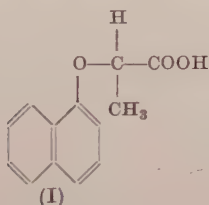


Studies on synthetic growth substances. III. The steric relations of the optically active α -phenoxy-propionic acid

By ARNE FREDGA and MAGNUS MATELL

With 5 figures in the text

In the second paper of this series (1) it was reported, that α -(1-naphthoxy)-propionic acid (I) and α -(2-naphthoxy)-propionic acid (II) with *opposite* directions of rotation have the *same* side chain configuration. According to experiments by Dr. B. ÅBERG (1,2), the (–)-form of I and the (+)-form of II show a greater auxin effect than their respective antipodes (for the acid II the difference between the antipodes is very pronounced). A correlation between the growth-regulating activity and the steric configuration of the side chain is thus established in this case.



The experiments have now been extended to the α -phenoxy-propionic acid (III), a growth substance of rather weak physiological activity. Dr. ÅBERG has also in this case found a marked difference between the antipodes, the (+)-form being far more effective than the (–)-form. These experiments will be described in a separate publication (3). In the following it will be shown, that the (+)-phenoxy-propionic acid (III) has the same configuration as the (+)-form of II. A correlation between the growth substance effect and the steric configuration is thus found in this case as well.

In order to establish the steric connections between the phenoxy-propionic acid and the naphthoxy-propionic acids, we have firstly studied the melting point diagrams of the different systems of active acids (4). The inactive phenoxy-propionic acid is a true racemic compound, melting about 30° higher than the antipodes (fig. 1). (+)-Phenoxy-propionic acid gives with both antipodes of I curves of the common eutectic type (fig. 2–3); the diagrams are very similar and permit no conclusions as to the steric connections. With the antipodes of II, however, diagrams of different types are obtained. (–)-Phenoxy-propionic acid gives with the (+)-form of II a molecular compound (fig. 4), obviously in the ratio 1:1, while the acids having the same direction of rotation give a common eutectic

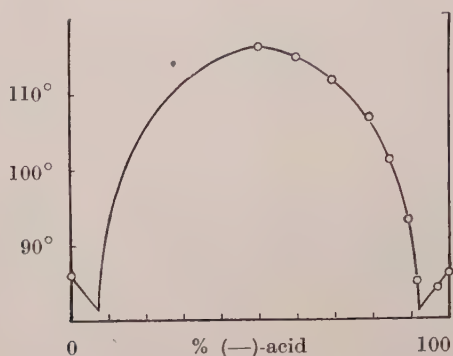


Fig. 1. (+)- and (-)- α -Phenoxy-propionic acid.

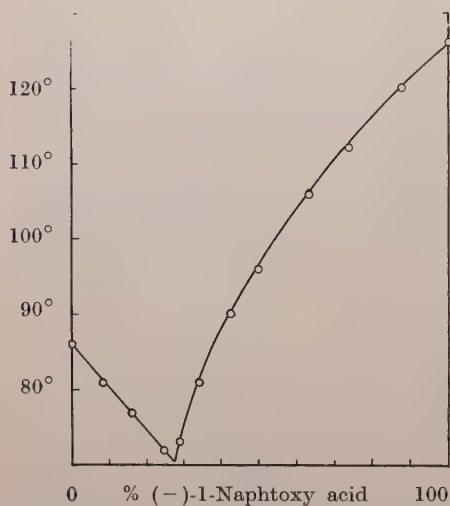


Fig. 2. (-)- α -(1-Naphthoxy)-propionic acid and (+)- α -Phenoxy-propionic acid.

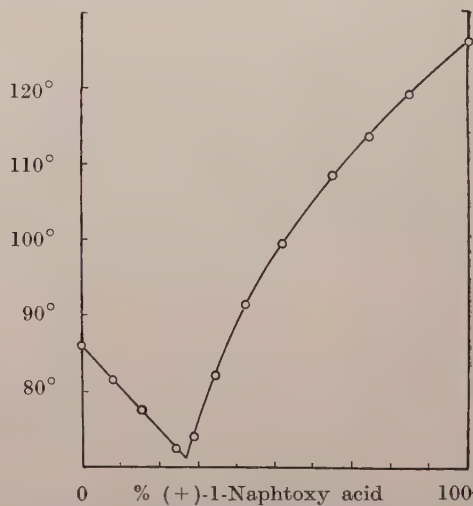


Fig. 3. (+)- α -(1-Naphthoxy)-propionic acid and (+)- α -Phenoxy-propionic acid.

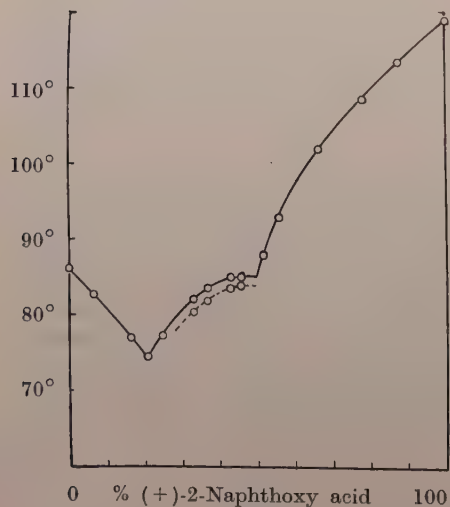


Fig. 4. (+)- α -(2-Naphthoxy)-propionic acid and (-)- α -Phenoxy-propionic acid.

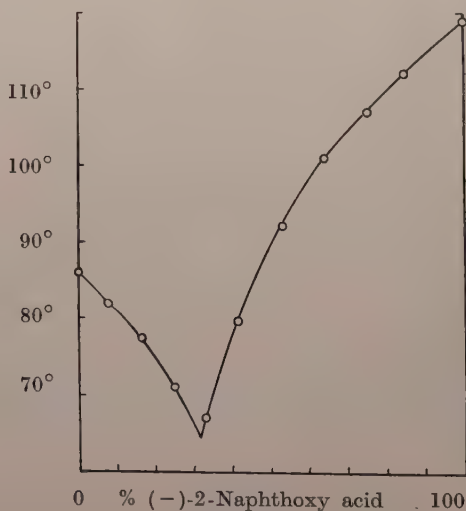


Fig. 5. (-)- α -(2-Naphthoxy)-propionic acid and (-)- α -Phenoxy-propionic acid.

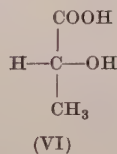
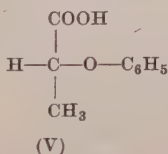
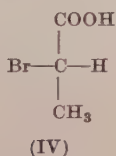
(fig. 5). The formation of the molecular compound, which is evidently a quasi-racemic compound, indicates that the acids having *opposite* directions of rotation have also *opposite* configurations.

The molecular compound is dimorphic, the low-melting modification giving a separate curve branch in the diagram (fig. 4). The two modifications could also be studied in the hot stage microscope according to KOFER and KOFER (5). The existence of a second modification of the *racemic* phenoxy-propionic acid could be established in the same way, but this modification is very unstable, and its melting-point could not be determined. As reported earlier (1), the racemic (2-naphthoxy)-propionic acid has three polymorphic modifications. A crystallographic examination of the different modifications of the quasi-racemic compound and the two true racemic compounds would be of interest.

Optically active phenoxy-propionic acid was also synthesised from (–)-bromopropionic acid and sodium phenolate. A *dextrorotatory* phenoxy-propionic acid was obtained, whose rotatory power indicated, that no significant racemisation had taken place during the reaction. Sodium 2-naphtholate gives, under strictly analogous conditions, *dextrorotatory* (2-naphthoxy)-propionic acid (1). As it is most unlikely that the steric course of the substitution was different in the two cases, we have here an independent proof that (+)-phenoxy-propionic acid and (+)-(2-naphthoxy)-propionic acid have the same configuration.

As both methods must be considered as very reliable and give consistent results, the steric connections of these acids can be regarded as definitely established.

The (–)-bromopropionic acid is generally assigned the stereoformula IV (6). According to modern views, the reaction between bromopropionate ion and phenolate ion is accompanied by inversion of the configuration. In such case, the (+)-phenoxy-propionic acid is represented by the stereoformula V. The antipodes of the phenoxy-propionic acid and the two naphthoxy-propionic acids,



which have the greater auxin effect are thus *probably* sterically related to D-(–)-lactic acid (stereoformula VI).

Experimental

The *racemic* α -phenoxy-propionic acid was obtained in excellent yield from sodium phenolate and bromopropionate in dilute ethanol at room temperature, using excess of phenol. 30.6 g (0.2 mole) of α -bromopropionic acid and 38.0 g (0.4 mole) of phenol were dissolved together in 90 ml ethanol and an ice-cooled solution of 20.0 g (0.5 mole) sodium hydroxide in 30 ml of water was carefully added. After standing for 5 days, the solution was evaporated to dryness by a strong current of air, the residue was transferred to a separating funnel containing water and ether and the pH was adjusted to 8 by the addition of ammonia and dilute hydrochloric acid. The phenol was taken up in the ether, the aqueous layer was separated and treated with a current air to remove the dissolved ether. On

acidification with hydrochloric acid in excess, the phenoxy acid was obtained as a crystalline precipitate. The yield of crude product was 33.0 g (99.5 %); after three recrystallisations from benzene (once with charcoal) and one from carbon tetrachloride 23.2 g remained. M. p. 116°.

0.2288 g acid: 12.90 ml 0.1066-N NaOH.

$C_9H_{10}O_3$ Equiv. wt. calc. 166.2, found 166.4.

The *racemic acid* was resolved by the method of FOURNEAU and SANDULESCO (7) using yohimbine. The acid isolated from the alkaloid salt was recrystallised from carbon tetrachloride and cyclohexane. M. p. 86°—87°.

0.2069 g acid: 11.65 ml 0.1066-N NaOH.

$C_9H_{10}O_3$ Equiv. wt. calc. 166.2, found 166.6.

0.2484 g acid dissolved in absolute ethanol to 10.00 ml: $2\alpha_D^{20} = +1.955^\circ$. $[\alpha]_D^{20} = +39.3^\circ$; $[M]_D^{20} = +65.4^\circ$.

The rotatory power found is in excellent agreement with the values given by FOURNEAU and SANDULESCO (7).

On evaporation of the mother liquor from the first crystallisation of the yohimbine salt at room temperature to about half its volume, a second crop of crystalline salt was obtained. The remaining mother liquor gave, on evaporation to dryness, a gum-like residue. The crystalline salt was combined with salt obtained from the mother liquors from the higher fractions of the yohimbine salt. After several recrystallisations a second portion of the salt of the pure (+)-acid was obtained. When the gum-like residue was treated with dilute sulphuric acid, it gave a phenoxy acid of $[\alpha]_D^{20} = -28^\circ$. As the antipodes are far more soluble than the racemic acid, this fraction was rapidly extracted with hot chloroform and washed with a little cold carbon tetrachloride. The undissolved acid had a very low activity while the chloroform extract on evaporation yielded an acid having $[\alpha]_D^{20} = -36^\circ$. Maximum activity was obtained by repeated crystallisations from cyclohexane and carbon tetrachloride. M. p. 86—87°.

0.1923 g acid: 10.82 ml 0.1066-N NaOH.

$C_9H_{10}O_3$ Equiv. wt. calc. 166.2, found 166.7.

0.2226 g acid dissolved in absolute ethanol to 10.00 ml: $2\alpha_D^{20} = -1.75^\circ$. $[\alpha]_D^{20} = -39.3^\circ$; $[M]_D^{20} = -65.3^\circ$.

The *levorotatory α -bromopropionic acid* was obtained according to RAMBERG (8, 9). As the preparation of optically pure acid is very tedious, an acid having $\alpha_D^{20} = -27.49^\circ$ (1 dm, homogeneous) containing 54.9 % of active acid was used. The reaction with sodium phenolate was carried out as described above for the racemic acid, using 8.55 g α -bromopropionic acid, 9.3 g phenol and 5.7 g sodium hydroxide in 30 ml ethanol + 15 ml water. The yield of crude product was practically quantitative; it was decolourised and recrystallised from cyclohexane and carbon tetrachloride. Two colourless fractions were obtained.

Fraction 1. 4.90 g. $[\alpha]_D^{20} = +10.8^\circ$.

Fraction 2. 2.08 g. $[\alpha]_D^{20} = +37.1^\circ$.

The total amount of pure acid, 6.98 g, represented 77 % of the theoretical yield and the average percentage of active acid was 47.4 %. As the antipodes are far

Table 1

(+) and (-)-III

% (-)-III	m. p.
0.0	86°
50.0	116°
60.0	114.5°
69.5	111.5°
79.3	106.5°
84.7	101°
89.6	93°
92.0	85°
97.1	84°
100.0	86°

Table 2

(-)-I and (+)-III

% (+)-I	m. p.
0.0	86°
8.2	81°
15.9	77°
24.8	72°
29.0	73°
33.8	81°
41.9	90°
49.8	96°
63.0	106°
73.4	112°
87.5	120°
100.0	126°

Table 3

(+) and (+)-III

% (+)-I	m. p.
0.0	86°
8.2	81.5°
15.7	77.5°
24.8	72.5°
29.0	74°
34.9	82°
42.8	91.5°
52.3	99.5°
65.2	108.5°
74.5	113.5°
85.3	119°
100.0	126°

Table 4

(+) and (-)-III

% (+)-II	m. p.
0.0	86°
6.6	83°
16.6	77°
20.9	74.5°
24.9	77°
33.2	80.5°
36.8	82°
42.9	83.5°
46.0	84°
51.8	85°
56.2	88°
66.4	93°
78.1	102°
87.6	108.5°
100.0	113.5°
	119°

Table 5

(-)-II and (-)-III

% (-)-II	m. p.
0.0	86°
8.0	82°
16.4	77.5°
25.0	71°
32.9	67°
41.3	79.5°
53.0	92°
63.9	101°
75.1	107°
84.4	112°
100.0	119°

more soluble than the racemic acid, the mother liquors must have contained a considerable excess of (+)-acid. It can thus be concluded that no significant racemisation took place in the course of reaction.

Melting point diagrams. The samples were prepared by dissolving weighed quantities of the substances in a few drops of pure acetone; after evaporation of the solvent the residue was powdered and carefully dried. All melting points were determined in a KOFER hot stage microscope (5). The results are given in figures 1—5 and tables 1—5, where the composition of the samples is given in mole-%.

SUMMARY

It was found that (+)- α -phenoxy-propionic acid (III) is sterically related to (+)- α -(2-naphthoxy)-propionic acid (II) and (—)- α -1-naphthoxy)-propionic acid (I). These three acids have greater auxin activity than their respective antipodes. They have *probably* the same configuration as D-(—)-lactic acid.

Laboratory of Organic Chemistry, Chemical Institute, University of Uppsala and Institute of Organic Chemistry, Royal Agricultural College, Uppsala, November 1951.

REFERENCES: [1] A. Fredga and M. Matell, Arkiv Kemi 3 (nr 47), 429 (1951). — [2] B. Åberg, Arkiv Kemi 3 (nr 59), 549 (1951). — B. Åberg, Private communication. — [4] A. Fredga, The Svedberg 1884 ³⁰/₈ 1944, Uppsala 1944, p. 261. — [5] L. Kofler and A. Kofler, Mikro-Methoden zur Kennzeichnung organischer Stoffe und Stoffgemische, Innsbruck 1948. — [6] K. Freudenberg, Stereochemie, Leipzig and Wien 1933, p. 703. — [7] E. Fourneau and G. Sandulesco, Bull. soc. chim. France [4] 31, 988 (1922). — [8] L. Ramberg, Ann. 349, 324 (1906). — [9] —, Ann. 370, 234 (1909).

Tryckt den 31 maj 1952.

Uppsala 1952. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

Versuche über den karyolytischen Effekt normaler und sarkomatöser Seren auf Zellen verschiedener tierischer Organe

Von SALVATORE DI BELLA

Mit 1 Figur im Text

Einwirkungen von Seren normaler sowie sarkomatöser Rattenserum auf Leber-Zellen normaler und Tumor-tragender Tiere sowie auf Tumor-Zellen (hier propagierte Jensensarkome und Mäuse-Ascites-karcinom), die teils mit dem geprüften Rattenserum homolog, teils heterolog waren, sind im Frühjahr 1949 in diesem Institut gefunden und beschrieben worden.^{1,2}

Um diesen interessanten karyolytischen Effekt, besonders die Spezifität der Zellkerne kennen zu lernen, habe ich denselben an verschiedenen Substraten und mit verschiedenen Seren untersucht, und zwar mit einer der früher verwendeten ähnlichen Methodik. (Vgl. auch Science 114, 685 (1951.))

Von den zu prüfenden macerierten, ganz frischen Organen wurden also auf Objekt-Trägern Ausstriche (smear-preparatous) in der üblichen Weise hergestellt, die entweder mit Methanol oder durch gelindes Erwärmen fixiert wurden. Die auf den Objekt-Trägern getrockneten Präparate wurden mit dem zu untersuchenden Serum (oder zur Kontrolle mit Ringer-Lösung) während verschiedener Zeiten inkubiert. Dann wurden die Präparate sorgfältig mit Leitungswasser gewaschen und hierauf nach 24-stündigem Verweilen in 96 %igem Alkohol nach FEULGEN mit dem SCHIFF'schen Reagens gefärbt.

Durch die Inkubation verlieren die Zellkerne des inkubierten Gewebes allmählich und je nach der Dauer der Inkubation ihre Fuchsin-Färbbarkeit nach der FEULGEN-Methodik und man beobachtet statt der intensiven roten Farbe nur eine schwache Rosa-Färbung, häufiger vollkommene Farblosigkeit der Kerne, die auf eine Veränderung der Kern-Nukleinsäuren bzw. der Kern-Nukleoproteide schliessen lässt.⁴

Der karyolytische Effekt, der unter verschiedenen experimentellen Bedingungen und unter Verwendung verschiedener Substrate (Tierorgane) studiert wurde, entsteht unter der Einwirkung des Serums normaler sowie sarkomtragender Ratten, ferner des Serums von Meerschweinchen, Kaninchen und ebenfalls — entgegen früheren Beobachtungen — des Menschen.

¹ H. v. EULER, L. HELLER u. CHR. CURMAN, Dieses Arkiv 1, No 8; 1949.

² H. v. EULER, L. HELLER u. CHR. CURMAN, Dieses Arkiv 1, No 36 und No 44; 1949. — Dieses Arkiv 1, No. 50; 1949.

³ B. ROMEIS, Taschenbuch d. Mikroskop. Technik. München-Berlin 1943.

⁴ Ich habe mich in dieser Untersuchung auf den Nachweis der Feulgenfärbung beschränkt, die eindeutig ist als die Beobachtungen der Färbbarkeit nach May-Grünwald und Giemsa.

Als Substrate werden Ausstriche verschiedener Organe verwendet, nämlich (ausser Leber) von: Milz, Nieren, Lunge und Herz. Dieselben wurden mit normalen und mit sarkomatösen Seren geprüft; Unterschiede konnten nicht festgestellt werden.

Es war zunächst versucht worden, den karyolytischen Effekt vom immunologischen Standpunkt aus zu erklären. Es waren steigende Dosen von Rattenleber-Homogenaten in Ringerlösung nach der üblichen immunologischen Technik in Kaninchen injiziert worden, um eine Sensibilisation hervorzurufen; indessen konnte mit dem Serum der sensibilisierten Tiere kein karyolytischer Effekt erhalten werden.

V. K. GIRI¹ studierte bei der Fortsetzung der Versuche von EULER und L. HELLER die Wirkungsart der die Kernsubstanz angreifenden Stoffe. Er injizierte Ratten mit Dosen von 100–600 γ Colchicin und fand in dem 24 Stunden nach der Injektion gewonnenen Blutserum eine erhebliche Abnahme der FEULGEN-Färbbarkeit, bei allen Versuchen, bei denen das lebende Tier die Colchicin-Injektionen erhalten hatte. Andere Mitose-hemmende Stoffe wie Akridin², ferner Urethan und camphersaures Natrium zeigten keine oder nur sehr schwache Wirkung.

EULER, HELLER und CURMAN³ haben in Betracht gezogen, dass der karyolytische Effekt durch ein Enzymsystem hervorgerufen wird, welches die Desoxyribo-Nukleinsäuren bzw. die Nukleoproteide des Zellkernes angreift. Ob die Annahme einer Desoxyribo-Nuklease dazu ausreicht, lässt sich noch nicht entscheiden.

Besonders von letzterem Gesichtspunkt aus wurden folgende Punkte untersucht:

- 1) Das Verhalten des Serums normaler und sarkomatöser Ratten nach vorhergehender Erhitzung auf 50–60°;
- 2) Der Einfluss der Inkubations-Dauer;
- 3) Der Einfluss mitose-hemmender Substanzen auf das Rattenserum in vitro;
- 4) Der Einfluss des frischen und des erhitzten Rattenserums auf isolierte Desoxyribo-Nukleinsäure;
- 5) Der Einfluss von Röntgen-Bestrahlung (einmalige Dose von 1 000 r) der lebenden normalen oder sarkomatösen Versuchsratten auf den karyolytischen Effekt ihres Serums und auf die als Substrat verwendete Leber;
- 6) Der karyolytische Effekt des Serums von Ratten, welche mehrere Injektionen von Buttergelb (Dimethyl-amino-azo-benzol) erhalten hatten.

Versuchsmethodik

Als Versuchstiere wurden hauptsächlich geschlechtsreife Ratten (Gewicht 150–350 g) verwendet.

Wie sich schon früher zeigte, hatten Geschlecht und (in gewissen Grenzen) Alter wenig Einfluss auf den karyolytischen Effekt. Zur Untersuchung kamen auch Jensen-Sarkome und Benzpyren-Sarkome tragende Ratten.

Die von mir angewandte Arbeitsweise schloss sich, wie erwähnt, nahe an diejenige an, welche bei den vorhergehenden Versuchen (Dieses Arkiv 1, No 44 u. 50) zur Anwendung gekommen war. Meistens habe ich als Substrat Ratten-Leber verwendet,

¹ V. K. GIRI, *Nature*, 165, 24 (1950).

² Vgl. hierzu H. LETTRÉ, *Naturwissenschaften*, 33, 75 (1946). — *Erg. d. Enzymforsch.* 10, 269 (1949). — H. u. R. LETTRÉ, *Naturwiss.* 33, 281 (1947).

³ H. v. EULER, L. HELLER u. CHR. CURMAN, *Dieses Arkiv* 1, No 44; 1949, S. 383.

welche unmittelbar nach Tötung des Tieres in der Latapie-Mühle fein verteilt und dann kurz homogenisiert wurde. In einzelnen Versuchen wurden auch andere Organe verwendet.

Die sorgfältig auf Objektträgern hergestellten Abstriche wurden mit Methanol 3 Minuten fixiert und nach Abspülen mit Wasser getrocknet.

Auf die lufttrockenen Abstriche wurden einige Tropfen des zu untersuchenden Serums aufgetragen (bei den stets vorgenommenen Kontrollversuchen die gleiche Menge Ringerlösung). Die Inkubation wurde unter möglichst aseptischen Bedingungen vorgenommen, und zwar in luftdicht verschlossenen Petrischaalen.

Nach der genau gemessenen Inkubationszeit wurde das Präparat mit Wasser gewaschen und nach kurzer Behandlung mit 96%igem Alkohol nach FEULGEN gefärbt.

Ergebnisse

Von unseren Versuchsergebnissen seien hier die folgenden angeführt:

1. Die Färbbarkeit der Zellkerne aus der Leber normaler oder sarkomatöser Ratten erweist sich unabhängig davon, ob die Leber-Ausstriche vor der Inkubation 3 Minuten mit Methanol fixiert oder ohne vorhergehende Fixierung direkt inkubiert wurden.

2. Der karyolytische Effekt des Serums normaler oder sarkomatöser Ratten zeigt sich deutlich bereits nach einer Inkubationsdauer von 30 Minuten bei 37°; der Effekt wird maximal nach 1–2-stündiger Inkubation und war in allen Fällen nach 16-stündiger Inkubation noch unverändert.

3. Erhitzt man die verwendeten normalen oder sarkomatösen Seren vor der Inkubation 30 Minuten auf 60°, so werden sie karyolytisch unwirksam.

4. Der karyolytische Effekt der Seren wird vollständig aufgehoben, wenn man dem inkubierten System minimale Mengen von Colchicin, von 1,4 Dioxy-Naphtalin oder von Akridin zusetzt. Der von GIRI *in vivo* beobachtete Effekt macht sich also auch *in vitro* (als Enzymhemmung) geltend.

Tabelle 1

Leber normaler und sarkomatöser Ratten nach Inkubation mit homologem oder heterologem Rattenserum.

Inkubation mit	Dauer der Inkubation	Intensität der FEULGEN-Färbung
—	— (Kontrolle)	+++
Ringer	16 Stunden	+++
Serum	15 Minuten	+++
»	30 »	++-
»	60 »	+--
»	120 »	---
»	16 Stunden	---

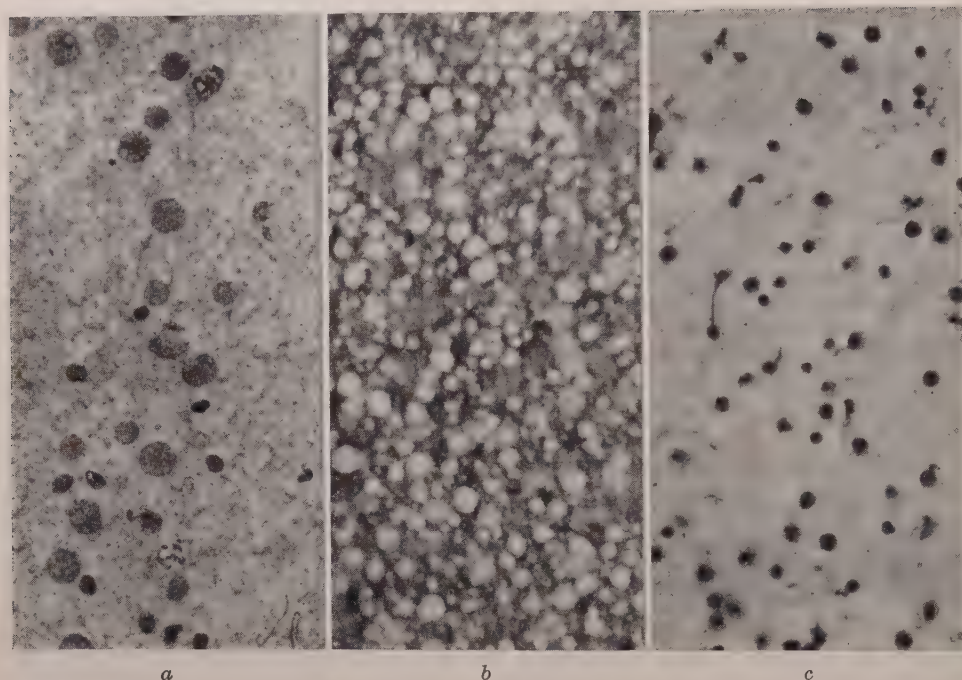


Fig. 1. Ausstrich-Präparate der norm. Rattenleber (Vergr. 1:400) nach Inkubation mit
a) Ringer-Lös. (Kontrolle), b) Norm. Serum, c) Norm. Serum 30 Min. auf 60° erwärmt.

5. Wird eine konzentrierte Lösung von Desoxyribo-Nukleinsäure¹ 30 Minuten mit normalem Rattenserum inkubiert so beobachtet man eine Wirkung, welche dem karyolytischen Effekt entspricht, die FEULGEN-Färbung bleibt also nach der Inkubation aus, mit anderen Worten, die Desoxyribo-Nukleinsäure ist durch Enzyme

Tabelle 2

Leber normaler Ratten inkubiert mit norm. oder sarkom., nicht erhitztem oder 30 Min. auf 60° erhitztem Rattenserum.

Zustand des Serums	Dauer der Inkubation	Intensität der FEULGEN-Färbung
Nicht erhitzt	1 Stunde	— — —
» »	10 Stunden	— — —
Erhitzt auf 60°	1 Stunde	+ + +
» » »	10 Stunden	+ + +

¹ Dargestellt aus Kalbsthymus. Siehe L. AHLSTRÖM, EULER, I. FISCHER, L. HAHN u. B. HÖGBERG, Dieses Arkiv 20 A, No 15 (1945).

Tabelle 3

Normale Ratte 170 g, 5 Monate alt. — Jensensarkom-Ratte 17311, 16 g.

Substrat. Leber bestrahlt	Serum	Intensität der FEULGEN-Färbung
Normal	— (Kontrolle)	+++
Sarkomatös	—	+++
Normal	} homolog	++-
Sarkomatös		++-
Normal	} homolog; 30 Min. bei 60°	+++
Sarkomatös		+++
Normal	} heterolog; bestrahlt norm. u. sarkom.	++-
Sarkomatös		++-
Normal	} heterolog; 30 Min. bei 60°	+++
Sarkomatös		+++

des Serums verändert worden. Verwendet man aber zu diesem Versuch Ratten-serum, das vorher 60 Minuten auf 60° erhitzt worden ist, so hat die Inkubation keinen Einfluss auf die FEULGEN-Färbbarkeit der Desoxyribo-Nukleinsäure.

6. Durch Injektionen von Buttergelb (Dimethyl-amino-azobenzol) werden, wie KINOSITA¹ gezeigt hat, Tumoren der Leber hervorgerufen, deren Bildung in den letzten Jahren besonders von H. DRUCKREY² studiert wurde. Um zu untersuchen, ob und wann eine Veränderung im Enzymgehalt des Serums des injizierten Tieres einsetzt, wurde das Serum einer Ratte des hiesigen Instituts-Stammes nach 10 Buttergelb-Injektionen auf seine karyolytische Wirkung hin untersucht. Es zeigte den *normalen karyolytischen Effekt*. Der Versuch soll nach einer grösseren Anzahl von Buttergelb-Injektionen wiederholt werden, wenn die Leber des Tieres bereits cancerisiert ist.

7. Es ist bekannt, dass Röntgenstrahlen den Stoffwechsel in den Zellkernen, besonders der Desoxyribo-Nukleinsäure stark beeinflussen.³ Aus diesem Grund konnte ein Einfluss einer Röntgen-Dose auf den karyolytischen Effekt erwartet werden. Eine normale und eine Jensensarkom-tragende Ratte wurden in der Radio-pathologischen Institution des Karolinischen Institutes⁴ mit je 1000 r bestrahlt (Strahlung einem mit 160 KV und 7 mA betriebenen Rohr, Bestrahlungsdauer 15,5 Min., Filter 0,5 mm Cu-Folie, Abstand 30 cm). 20 Minuten nach der Bestrahlung wurden die Tiere durch Dekapitierung getötet. Blutserum und Leber wurden sofort verarbeitet.

¹ R. KINOSITA, Trans. Jap. Path. Soc. 27, 665 (1937). — C. J. KENSLER *et al.*, Science, 93, 308 (1941).

² H. DRUCKREY u. K. KÜPFMÜLLER, Z. f. Naturforsch. 3 b, 254, 1948. — Z. f. Krebsforsch. 56, 407, 1949. — BETH VON EULER, HANS VON EULER u. H. HASSELQUIST, Dieses Arkiv 4 (1952), im Druck.

³ Siehe auch EULER u. G. DE HEVESY, Det k. Danske Vid.Selskab, 17, Biol. No 8, 1942.

⁴ Herr Laborator Dr. med. SANTESSON hat die Bestrahlungs-Apparatur zur Verfügung gestellt, wofür ihm auch hier bestens gedankt sei.

Die mit den Seren und den Lebern der bestrahlten Ratten erhaltenen karyolytischen Effekte gehen aus obiger Tabelle 3 hervor.

Als Ergebnis der Bestrahlungsversuche kann angegeben werden, dass durch die Behandlung der Versuchstiere mit der Röntgendosis 1 000 r der karyolytische Effekt wenig aber deutlich geschwächt wurde, jedenfalls weniger als durch die Erwärmung der Seren auf 60°.

Stockholm, Universität, Vitamin-Institut u. Inst. für organ.-chem. Forschung.

Tryckt den 31 maj 1952

Uppsala 1952. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

Effect of X-rays on the incorporation of ^{14}C into tissue fractions of the mouse

By G. HEVESY and GUDRUN DREYFUS

With 14 figures in the text

Mitotic arrest is possibly the most conspicuous early effect of ionizing radiation on the living organism. From the view-point of the chemist cell division is a result of intense and properly correlated cellular synthesis. Correspondingly, one expects the mitotic arrest to be due, at least partly, to an interference with some of these synthetic processes. It was found already several years ago, that irradiation of rat Jensen sarcoma with an X-ray dose of some hundred r interferes with the formation of desoxyribo nucleic acid in the sarcoma.¹ In these experiments the rate of incorporation of ^{32}P administered as sodium phosphate into the desoxyribo nucleic acid of the sarcoma of irradiated and control rats was compared. The former were found to take up much more ^{32}P than the controls. While some of this difference was due to the different rate of penetration of ^{32}P into the sarcoma cells, a very appreciable part of it had to be ascribed to an about 50 per cent inhibition of desoxyribo nucleic acid formation. Similar results were obtained from investigations of normal organs of the rat. The blocking effect of radiation on the formation of labelled desoxyribo nucleic acid was already observed 1/2 hour after irradiation took place.

An objection raised to our results was that the incorporation of ^{32}P with desoxyribo nucleic acid may indicate a rephosphorylation of the molecule only. An enzymic splitting off of phosphate groups may be followed by a rephosphorylation process which in the presence of labelled phosphate, labelled ATP or an other phosphate donor results in an incorporation of ^{32}P with the desoxyribo nucleic acid molecule. Though these objections seemed not justified or to a minor extent only so, — in the growing Jensen sarcoma the rate of additional formation of desoxyribo nucleic acid does not lag very much behind the rate of formation of desoxyribo nucleic acid ^{32}P — they induced us to study the effect of irradiation on the incorporation of ^{14}C with the purines of desoxyribo nucleic acid.¹

In experiments previously described² acetate labelled in the carboxyl group was

¹ The litt. of earlier works, the first paper published being that of H. v. EULER and G. HEVESY. Kgl. Danske Videnskab. Selskab Biol. Medd. (1942), 17, 8, is to be found in G. HEVESY's contribution to Adv. of Biol. and Med. Physics (1948), 1, 409; see also B. HOLMES, Brit. Journ. Rad. (1947), 20, 450; (1949) 22, 487, G. HEVESY, Nature (1949), 163, 809. L. S. KELLY and H. B. JONES, Soc. Exper. Biol. Med. (1950), 74, 493. H. JONES, Rep. Oberlin College Symp. (1950) in print. A. HOWARD and S. R. PELC, Ciba Foundation Conference on Isotopes in Biochemistry. London (1951) p. 147.

² HEVESY, G., Nature (1949), 163, 809.

injected to suckling rats irradiated with 880 r and to control suckling rats. The silver purines were secured from the desoxyribo nucleic acid of various organs 4 to 7 hours after injection and their activity was compared. Incorporation of ^{14}C into the purines of the irradiated rats was found to be depressed by 20 to 70 per cent. For the liver fractions the mean values seen in Table 1 were obtained.

The results obtained indicate an arrest caused by irradiation in the formation of purine moiety of desoxyribo nucleic acid as well.

Abrams¹ investigated recently the effect of irradiation on the incorporation of C 14 with purines of the nucleic acids of the rat intestine using glycine — 1 — ^{14}C as source of C 14. He found C¹⁴ incorporation with DNA inhibited by 80 % and with RNA by 49 %, while the percentage incorporation into proteins was hardly affected.

Urethane is known to interfere with mitotic processes and we can thus expect large doses of urethane to depress nucleic acid formation. In a recent investigation Skipper² administered large doses of urethane (1800 mg/kg) and then ^{14}C labelled formate to mice and investigated the incorporation of ^{14}C into the viscera nucleic acids and into the total tissue of various organs. Incorporation of ^{14}C into the viscera nucleic acids was found to be depressed under the effect of urethane to about one half of the value found in controls, thus to a similar extent as the incorporation of acetate ^{14}C into nucleic acid was observed to be reduced under the effect of x-rays (cf. Table 1). Total tissue took up, however, in the urethane injected mice more formate carbon than in the controls. The latter effect is presumably due to a decrease in the sensitivity of the radioactive indicator (higher ^{14}C level) and was formerly observed³ in experiments in which following administration of labelled acetate the ^{14}C uptake by tissue was compared in the urethane injected mice and in controls.

The precursor of the nucleic acid ^{14}C may also have a higher activity level in the urethane injected mice than in the controls, but in spite of the increase in the activity level, due to the strongly inhibiting effect of urethane on nucleic acid formation, the ^{14}C content of the nucleic acid content of the urethane injected mouse is markedly lowered (the last mentioned effect overcompensates the first mentioned one).

As seen in Table 1 irradiation acts in a similar way not only on incorporation of ^{14}C into nucleic acid as does urethane but an increased incorporation of ^{14}C into tissue proteins is observed as well. The last mentioned effect is, however, less pronounced after irradiation and more difficult to reproduce than the effect observed after administration of urethane. In outgrown mice we found a significant increase in ^{14}C incorporation due to irradiation in the brain and possibly into the liver proteins (cf. Table 8). In experiments carried out by Forssberg and one of us, which shall soon be published and in which in contrast to this investigation fasting mice were used no increase in the ^{14}C incorporation into tissue proteins of irradiated mice could be observed.

Change in the Sensitivity of the Radioactive Indicator with time

The change in the sensitivity of the radioactive indicator with time plays an important rôle in many applications of radioactive tracers, this being especially the case

¹ ABRAMS, R., Arch. Biochem. (1951), 30, 90.

² SKIPPER, H. E., Texas Rep. Biol. and Med. (1950), 8, 543.

³ HEVESY, G., Nature (1949), 164, 1007. HEVESY, G., RUYSSSEN, R. and BEECKMANS, H. L., Experientia (1951), 7, 144.

in the study of the metabolism of acetate and other rapidly metabolizing carbon compounds.

Some years ago MARINELLI¹ studied the incorporation of ^{32}P into the bones a few days after irradiating one leg of the rabbit with a 3000 r dose, while the other legs were protected. He found that if ^{32}P was injected into the animal several days after irradiation of one of the legs, the irradiated leg contained only about 70 per cent of the ^{32}P content of the non-irradiated leg. The inhibition of radiophosphate uptake by the irradiated leg leads to a higher activity level of the plasma inorganic P and correspondingly to a higher ^{32}P uptake by the phosphorus compounds of the soft tissues. We meet thus indirect radiation effects. Radio-lesion of the bone may reflect itself in the rate of incorporation of ^{32}P into liver phosphatides and many other compounds. It is not the turnover rate itself of the liver phosphatides which is influenced, but the sensitivity of the registration of the turnover.

The application of ^{14}C as an indicator, especially in the form of rapidly metabolizing compounds such as acetate, may reveal a great variety of indirect radiation effects.

If we inhibit by irradiation ^{14}C labelled protein or phosphatide formation in the liver, the protein resp. phosphatide content of the plasma will decrease and all steps in which these compounds participate will be influenced as well.

If irradiation blocks the incorporation of acetate carbon into fatty acids or cholesterol, more ^{14}C may take its way through other metabolic pathways. Such an interference will lead to an increased ^{14}C level of the CO_2 of body fluids, the result of this increase being, for example, an enhanced ^{14}C incorporation in liver or muscle glycogen. A decrease in the amount of ^{14}C trapped in metabolic pools of Krebs' cycle due to irradiation lesions will act in the same way. This increase in the ^{14}C content of glycogen may not due to a larger glycogen production, but to a lowered sensitivity of ^{14}C as an indicator. A radiation lesion produced in the liver may thus be responsible for an enhanced ^{14}C incorporation into a muscle fraction.

In a similar way interference with the conversion of acetate into acetoacetate in the liver will interfere with the ^{14}C incorporation into muscle fractions, most of the muscle acetoacetate being presumably carried into that tissue from the liver. In this case, we interfere not only with the sensitivity of the indicator of processes taking place in the muscle, but even with the turnover rate.

The injected labelled acetate is diluted with endogenous acetate formed by catabolism of fatty acids and other compounds. If irradiation interferes with the catabolic processes or with the rate of interchange between intra- and extra hepatic fatty acids, but does not influence, or influences to a minor extent only the incorporation of acetate into fatty acids, the activity level of body acetate will be increased and we observe an increased ^{14}C incorporation in fatty acid fraction or protein samples, for example, which is due not to an increased turnover rate, but to a decrease in the sensitivity of the indicator. More ^{14}C is incorporated with the tissue fraction, but the amount of ^{12}C renewed may be practically the same, and vice versa.

While a change in the sensitivity of the radioactive indicator may be responsible for the change in the C^{14} uptake observed, this is far from always the case. Irradiation may divert C^{14} present in intermediary compounds of acetate metabolism from oxidation via the Krebs' cycle. Such diversions were repeatedly observed, for example, in experiments with liver slices.² Addition

¹ MARINELLI, L. D., *Radiology* (1941), 37, 169.

² A. B. PARDEE, C. HEIDELBERGER and V. R. POTTER, *J. Biol. Chem.* (1950), 186, 625.

of pyruvate, citrate, α -ketoglutarate or malonate was found to diminish the output of $^{14}\text{CO}_2$, while an increased incorporation of C^{14} into α -ketoglutarate and other compounds was found to take place. Furthermore Altman et assoc.¹ when investigating marrow homogenates of irradiated and of control rabbits incubated in the presence of α - ^{14}C -acetate found a markedly increased incorporation of C^{14} into the fatty acid of homogenates of the marrow of irradiated rabbits.

The application of ^{14}C as indicator may thus reveal radiation lesions both in the irradiated organ and other organs, due either to changes in the turnover rate or to the change in sensitivity of the indicator, only.

Some aspects of acetate metabolism

To the daily diet of the rat we can add a constant amount of acetate labelled in the carboxyl group and obtain an almost constant activity level of the body acetate. This activity level is measured by feeding phenylbutyric acid to the rat, isolating the excreted phenylbutyric acetate, and determining its ^{14}C content.

By comparing at the end of the experiment, the ^{14}C content of the fatty acid carbon of the liver with the corresponding value of the urinary phenylbutyric acetate, as shown by RITTENBERG and BLOCH², the rate of renewal of the liver fatty acids can be calculated.

In a recent investigation, PIHL and assoc.³ have shown that prolonged daily feeding of a constant amount of labelled acetate does not lead to a constant but to an increasing activity level of the body acetate with time. This contrasts with the results obtained when feeding heavy water which results in a practically constant deuterium level of the body fluids. Though intake of heavy water is followed by the formation of deuteriated body constituents which, in turn, are catabolized and form deuteriated water, in view of the large water content of the body (about 70 per cent) these additional amounts of catabolic heavy water do not much influence the deuterium content of the body water. In a similar way, the catabolism of ^{14}C labelled fatty acids and other compounds ensues in the formation of labelled acetate. In view of the low (much less than 1 per cent) acetate content of the body fluids the additional catabolic labelled acetate can not, however, be disregarded and correspondingly, in experiments of many days, through which a constant amount of labelled acetate is fed, a quite marked increase in the activity level of body fluid acetate takes place.

A very different behaviour of the labelled acetate is observed when it is administered, for example by intraperitoneal injection, at the start of the experiment⁴. The catabolism of the administered acetate leads to a large extent to the formation of $^{14}\text{CO}_2$, which is exhaled. In the rat the specific activity of the expiratory CO_2 increases in the course of the first 20 minutes (in the mouse during a shorter interval), absorption, distribution and metabolism of acetate taking some time. $^{14}\text{CO}_2$ formation being soon exhausted or almost exhausted while endogenous $^{12}\text{CO}_2$ is constantly produced, the specific activity of the respiratory carbon dioxide is bound to decrease markedly with time in the later phase of the experiment.

¹ K. I. ALTMAN, J. E. RICHMOND and K. SALOMON, *Biochem. et Biophys. Acta* (1950), 7, 460.

² RITTENBERG, D. J. and BLOCH, K. *Biol. Chem.* (1945), 160, 417.

³ PIHL, A., BLOCH K., and ANKER, H. S., *J. Biol. Chem.* (1950), 183, 441.

⁴ cf. HEVESY, G., RUYSSSEN, R., and BEECKMANS, M. L., *Experientia* (1951), 7, 144.

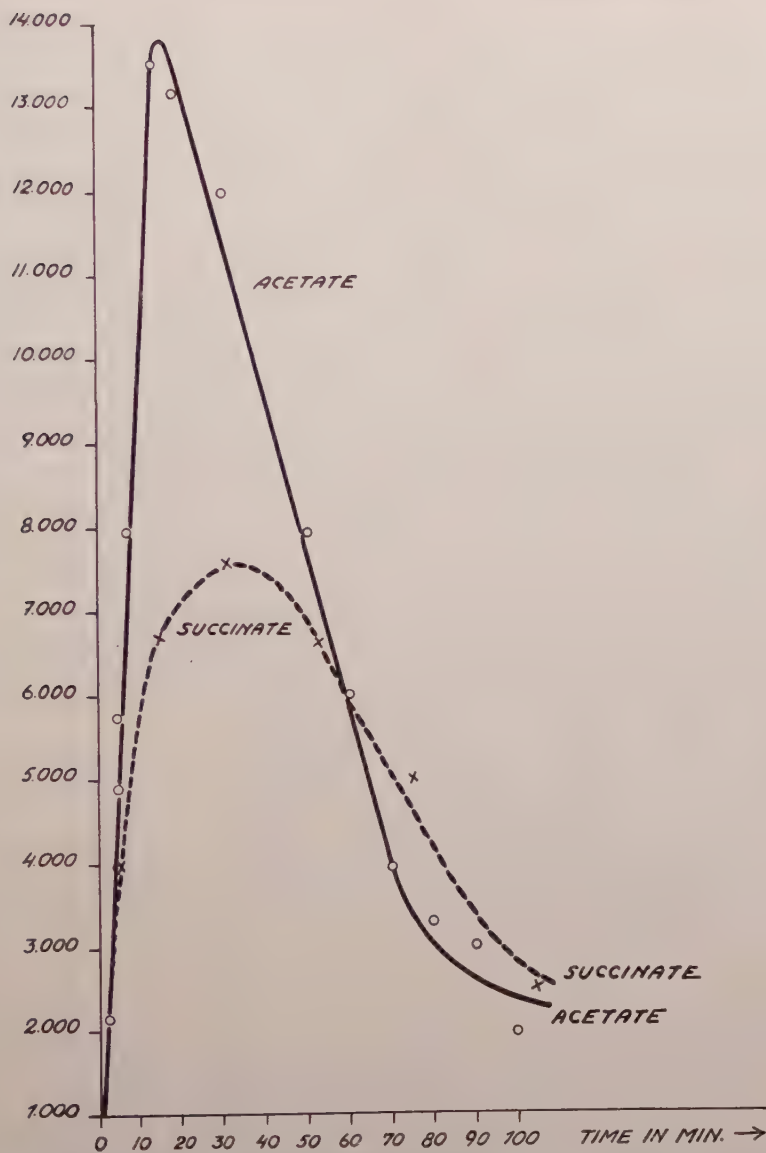


Fig. 1. Change in specific activity of the expiratory carbon dioxide following injection to rats of labelled acetate and succinate, respectively (Gould et al.).¹

After the lapse of 50 minutes, the specific activity of the exhaled carbon dioxide is only half of the value observed after the lapse of 20 minutes.

If the injected labelled carbon compound is metabolized at a less rapid rate than acetate or if we interfere with the normal metabolic rate of acetate in the early

¹ GOULD, R. G., SINEX, F. M., ROSENBERG, I. N., SOLOMON, A. K., and HASTINGS, A. B., J. Biol. Chem. (1949), 177, 295.

phase of the experiment the increase in the $^{14}\text{CO}_2$ content of the respiratory carbon dioxide will take place at a slower rate, than in that of normally metabolizing acetate and so will the decrease in the specific activity occurring in the later stage of the experiment. This is the case when the slower metabolizing labelled succinate is administered to rats. Fig. 1 which is plotted by making use of the data of Gould and assoc.¹ demonstrates the change in specific activity of the expiratory carbon dioxide following injection of labelled acetate and succinate respectively. The results obtained by the above mentioned authors clearly demonstrate the lower metabolic rate of succinate. The velocity constant of the conversion of acetate carboxyl carbon and succinate carboxyl carbon into carbon dioxide is found by the above mentioned authors to be 0.043 min^{-1} and 0.028 min^{-1} respectively.

If the irradiation influences the metabolic rate of acetate the produced change will reflect itself in a change in the slope of the time-specific activity curve of the exhaled carbon dioxide, as the amount of $^{14}\text{CO}_2$ contributed to the CO_2 exhaled in the time unit will now differ from that contributed by the controls. Catabolic changes in which labelled acetate does not participate, or participates to a minor extent only, may also influence the slope of the time-specific activity curves of exhaled carbon dioxide. The amount of $^{12}\text{CO}_2$ to which a given quantity of $^{14}\text{CO}_2$ is to be admixed will now be different. The change in the time-specific activity curves will reflect itself in activity figures for all tissue fractions into which CO_2 is incorporated. A metabolic interference which leads to an increase in the $^{14}\text{CO}_2$ content of the liver CO_2 (bicarbonate), so far as it does not influence glycogen turnover, will result in higher activity figures of glycogen. In this statement we disregard possible differences in the ^{14}C incorporation due to the fact that some ^{14}C enters glycogen by another way than through circulating CO_2 .

An increased ^{14}C content of the liver glycogen after irradiation may be due also to an increased turnover rate of glycogen. If this leads to an increase in the glycogen content of the liver it will be revealed by analytical data.² If the glycogen content remains constant during the experiment the increase in ^{14}C content may be due to an increased rate of formation of labelled glycogen compensated by an increased catabolism of almost inactive glycogen. An increased ^{14}C content of the liver glycogen after irradiation may, however, be due to a very different reason as well, to a change in the sensitivity of $^{14}\text{CO}_2$ as an indicator of $^{12}\text{CO}_2$. Is that to be the case then if $^{14}\text{CO}_2$ formation from acetate is slowed down, in the first phase of the experiment (during the first minutes), the $^{14}\text{CO}_2$ content of the liver bicarbonate will be lower in the irradiated animals than in the controls. Soon, however, the opposite will be the case and thus a larger incorporation of ^{14}C into glycogen will be observed (cf. Fig. 1).

If it is not the specific activity of the carbon dioxide which is influenced by irradiation, but it is the turnover rate of glycogen which is enhanced, we should find in all phases of the experiment more ^{14}C in the glycogen fraction. If, however, an increase in the ^{14}C content of the carbon dioxide is responsible for the changed ^{14}C uptake by the glycogen we should observe an increased ^{14}C incorporation into glycogen in the first phase of the experiment and a decreased one in the later phase, "Time experiments" may thus supply important information about the metabolic changes produced by irradiation.

¹ GOULD, R. G., SINEX, F. M., ROSENBERG, I. N., SOLOMON, A. K., and HASTINGS, A. B., *J. Biol. Chem.* (1949), 177, 295.

² N. NORTH and L. F. NIMS, *Fed. Proc.* (1949), 8, 119. M. H. ROSS and I. O. ELEY, *I. cell. comp. Physiolog.* (1951), 37, 163.

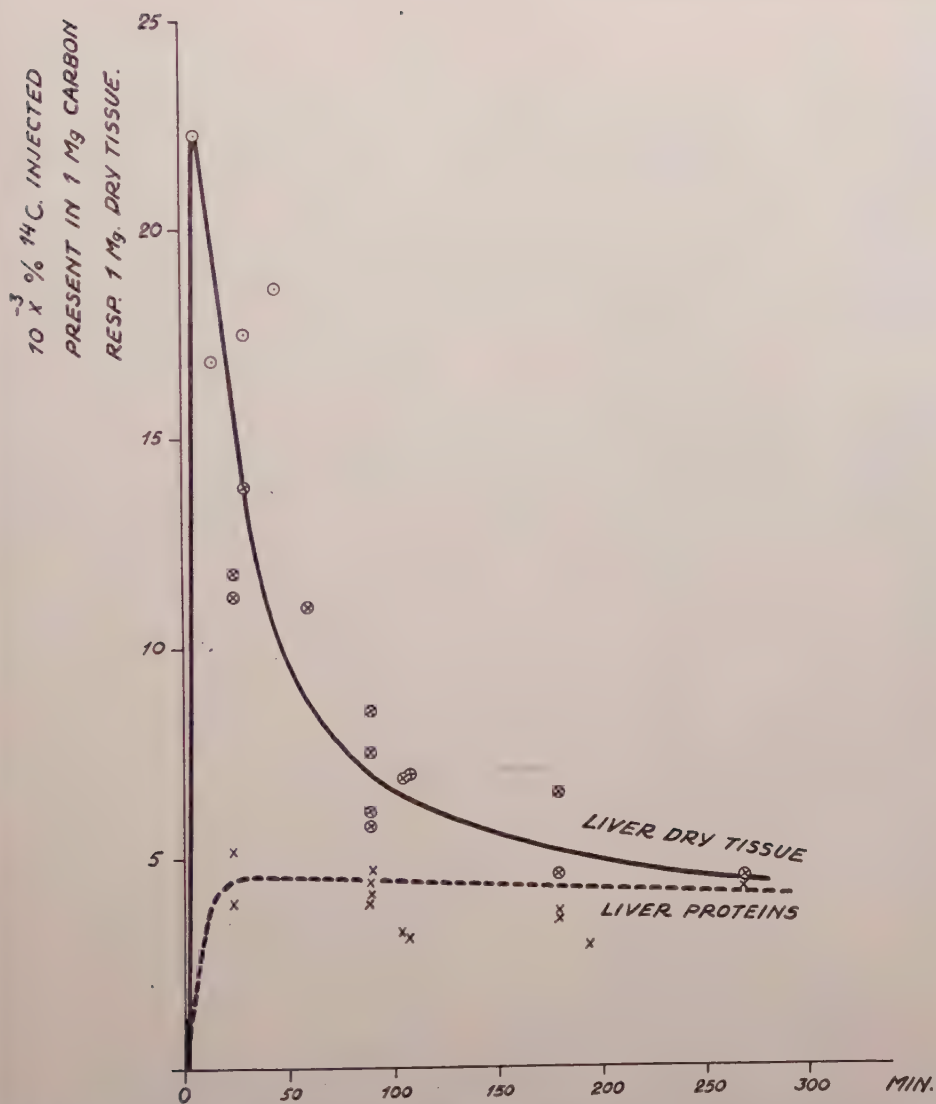


Fig. 2. Change of the C 14 content of liver dry tissue and liver proteins of mice injected with $\text{NaCH}_3{}^{14}\text{COO}$ with time. Each point represents the value obtained for 10 or more pooled livers. Values obtained for mice of different ages and races were plotted solely to demonstrate the great difference in the change of the C 14 content of the liver tissue and liver proteins with time.

Much of the respiratory CO_2 is the product of muscular metabolism. Changes in the specific activity of carbon dioxide produced in an organ with a minor contribution to the total CO_2 production of the organism may therefore not suffice to become clearly visible when comparing the specific activities of CO_2 of irradiated animals with that of controls. Though such comparisons are of importance they

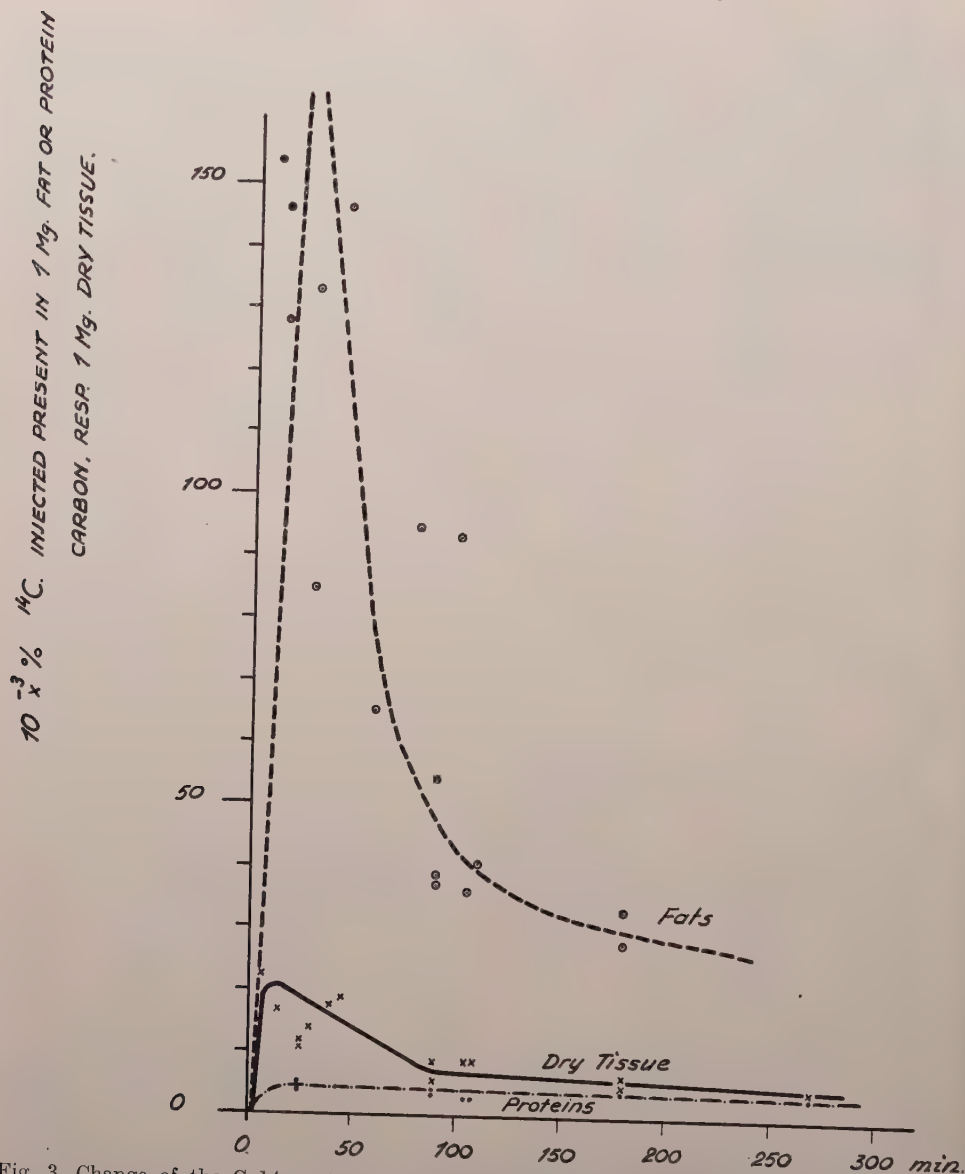


Fig. 3. Change of the $\text{C } 14$ content of liver fats, liver total tissue and liver proteins of mice injected with $\text{NaCH}_3 \text{ } ^{14}\text{COO}$ with time. Each point represents the value obtained for 10 or more pooled livers. Values obtained for mice of different ages and races were plotted solely to demonstrate the great difference in the change of the $\text{C } 14$ content of liver fats and liver proteins with time.

often are less revealing than investigations into the effect of irradiation on the ^{14}C content of tissue fractions.

We discussed above the possible effects of irradiation on the specific activity of catabolic carbon dioxide. We shall now consider the results of interference with

the rate of formation of another product of acetate metabolism with that of fatty acids.

Part of the acetate carbon which reaches the liver is rapidly incorporated into the fatty acids of the liver of the mouse. After the lapse of about 20 minutes the fatty acids show a maximum ^{14}C content, half of that value being observed only after the lapse of further 40 minutes. Many of the newly formed fatty acid molecules are soon leaving the liver by catabolic processes or exodus and, as in the mean time the activity level of the acetate and other fatty acid precursors is lowered, the disappeared active fatty acid molecules are replaced by less active ones. The marked decline in the activity level of acetate with time is, as already mentioned, due to the effect the injected labelled acetate is rapidly metabolized, while the diluting non-radio-active endogenous acetate due to incessant new-formation remains at a constant concentration level.

In the liver of mice killed at different intervals after injecting labelled acetate an acceleration of the rate of conversion of acetate into fatty acids can be expected to lead in the first minutes to an increased ^{14}C content of the fatty acids. However, when a maximum activity is reached (cf. right part of the curves in Fig. 1), due to the now increased rate of disappearance of the administered labelled acetate with time a more rapid decrease in the specific activity of the body acetate will take place and correspondingly the active fatty acid molecules will be more rapidly replaced by less active ones than in the absence of a metabolic accelerator. Thus, when a maximum fatty acid activity is reached the specific activity figures will decline more rapidly than they do in the case of the normally metabolizing liver and vice versa.

The rapid decline a few minutes only after the administration of the labelled acetate in the activity of the liver fats due to a large extent to the activity of fatty acids, is demonstrated in Fig. 2 and 3. These are showing also the very different behaviour of the liver proteins and also that the change in the activity of the total tissue with time much resembles the change in the activity of fats. The data were obtained by investigating mice of different race and age and were plotted with the sole reason to demonstrate the spectacular decline of the activity of liver fat and total tissue in contrast to that of proteins in the first hours of the experiment.

Administration of cyclopentylhexane, which is a metabolic accelerator was found to have the above described effect on the time-specific activity curves of liver fats.¹

Metabolic depressors can be expected to act in the opposite direction. Their presence may slow down the rate of incorporation of ^{14}C into fatty acids, but the activity level of the fatty acids will now be longer maintained, since the replacement of the active fatty acid molecules by less active ones takes place at a slower rate. Furthermore a decreased catabolic rate of glucose, for example, will lead to a reduced formation of fatty acids, which results (these fatty acids being almost inactive) in a reduced dilution of the labelled acetate leading in turn to a decrease in the sensitivity of ^{14}C as an indicator of fatty acids.

A comparison of the ^{14}C content of the total fat or of the phosphatides of mice injected with urethane with that of the controls brings out these effects of a metabolic depressor.²

¹ BEECKMANS, M. L. CASIER, M., and HEVESY, G., Arch. Internat. Pharmacodyn. and Ther. (1950), 80, 33.

² HEVESY, G. Nature, (1949) 164, 1007. HEVESY, G., RUYSSSEN, R. and BEECKMANS, M. L., Experimentia (1951), 7, 317. SKIPPER, H. A., Texas Rep. Biol. and Med. (1950), 8, 543.

Metabolic activators and depressors have — as seen above — a marked influence on the incorporation of ^{14}C into tissue fractions. If such effects were produced by irradiation with ionizing radiation, we should observe significant changes in the rate of incorporation of ^{14}C into tissue fractions and possibly in the specific activity and even in the amount of exhaled CO_2 .

When making the above remarks we have to envisage the existence of several competitive paths which acetate metabolism follows, the two carbon fragments finding their way into cholesterol, steroid hormones, hemin and fatty acids on one side and into citric acid, glutamic acid, proline, arginine on the other side. The suppression of any of these paths may lead to an increased ^{14}C incorporation in the metabolic products involved in the remaining paths.

Experimental

The X-ray tube applied was run with 180 KV and 7 milliamp. The distance between the anticathode and the surface of the paperbox in which the mice were placed was 40 cm.

Adult mice were irradiated for 3 min. with a dose of 295 r per min. The mice, had access to food all through the experiment. They were injected intraperitoneally or, in some cases, subcutaneously mostly with 0.1 ml of physiological sodium chloride solution containing in the carboxyl group labelled sodium acetate of an activity of 2 to 6 microcuries. In some experiments injection with acetate took place immediately after irradiation, in others up to several hours later. At least 10 mice were irradiated in each experiment. The mice were killed by decapitation. In most experiments blood plasma, liver, kidneys, intestinal mucosa, muscles and brain, in some cases femur, lungs and spleen were secured as well. The intestines were carefully rinsed before securing the mucosa. An aliquot of the organs was dried and the activity of the samples of the pooled organs of irradiated mice and that of the controls compared. From another aliquot of the organs the total fats were obtained by extracting the ground organs with a boiling mixture of ether-alcohol (1:3) for 3 hr. The filtrate obtained was evaporated *in vacuo* and the residue extracted with petroleum-ether. The evaporation of the petroleum-ether gave the total fats. In our later experiments these were purified with colloidal iron following the procedure of Folch and Van Slyke as described below.

In order to obtain the phosphatides, the total fats were dissolved in petroleum-ether and precipitated with twice the amount of cold acetone and 5 drops of an alcoholic solution of 4.5% MgCl_2 , precipitation being completed by standing for 2 hr in the refrigerator. The phosphatides were centrifuged. The precipitate dissolved in petroleum-ether was reprecipitated in the same way. After centrifugation the precipitate dissolved in petroleum-ether was washed with distilled water. Evaporation of the petroleum-ether gave the phosphatides.

The supernatants from the precipitation of the phosphatides were combined and evaporated. The residue was saponified by boiling for 8 hr with 10 cc of an aqueous solution of 40% KOH and 20 cc alcohol. After saponification the solution was extracted several times with petroleum-ether. To the petroleum-ether solution after being brought to a small volume twice its volume of a 0.5% solution of digitonin in 80% alcohol was added. The quantity of digitonin was about 5 times the amount of cholesterol expected. The precipitated cholesterol was first washed with 80%

alcohol to eliminate the excess of digitonin, then with a mixture of acetone-ether (1:2) and finally with ether; it was dried at 37°.¹

When investigating the effect of irradiation on cholesterol formation we compared the activity of cholesterol digitonin samples. The presence of digitonin reduced the activity of cholesterol to about to 1/4 of its value, conversion of cholesterol carbon into barium carbonate would have resulted in a still greater reduction of the activity figures.

The fat-free tissue after being repeatedly washed with water was repeatedly treated at 90° C for 10 min. with 5% trichloroacetic acid to obtain the raw proteins. These were abundantly rinsed with water, then dried by washing with alcohol and ether. Subsequently the activity of the protein samples was compared.

We purified in our later experiments the total fat samples with colloidal iron.² In the case of liver fats such a purification leads to an increase in the activity figures. In experiments taking 3 hours an average increase of 11 per cent was observed, while Dr. Beeckmans working in this laboratory found in experiments taking 15 minutes a 7 per cent average increase. Treatment with colloidal iron removes thus less active constituents of the liver fats, possibly urea, amino acids and other impurities. Some phosphatides are removed by their treatment as well. In experiments taking not more than a few hours the activity of phosphatides is less than the activity of the total fats of the same weight, the ratio of the activity of 1 mg total fat and 1 mg phosphatide being about 1.3. Some removal of less active phosphatides in the course of the purification process with colloidal iron will thus also lead to an increase in the activity of the total fats of the liver.

Purification with iron has very different effects on brain fats. After purification their activity decreases with 11 percent in experiments taking 3 hours. More active fractions are thus removed by this process. The decrease in the activity figures due to purification is much larger in experiments of short duration. In experiments taking 15 min. only, treatment with colloidal iron removes 3/4 of the ¹⁴C content of the total fats, 45% of that of the muscle fat and 1/3 of the intestinal mucosa.

The dry liver weight of fed mice weighing 22.7 g (mean value of a few hundred animals) was 0.31 g. Liver dry weight amounted to 28.2% of its fresh weight. We found the fat content of dry liver tissue = 21.7 %, that of fresh tissue = 7.4 %.³ In the liver of fed 15 gr mice Stetten and Grail⁴ found a fatty acid content of 4.5%. From the above data it follows that 61% of the liver fats is made out of fatty acids. 17.1% of the weight of the fresh liver was made out of proteins.

When comparing the activity of the dry total tissue or protein samples secured from irradiated mice and from controls, 50 mg of each of the dried samples we placed in an aluminium dish of 1.2 cm diameter and the activity of the samples was compared. The small size counters used had a mica window of about 2 mg per cm² and a background of about 3 counts per minute.

The fat samples, the activity of which was appreciably larger than that of the total dry tissue or protein samples were placed in Ottesen's micro dishes, which proved to be very suitable for this purpose. The counts measured for an infinitely

¹ SVERE, P. A., CHAIKOFF, I. L., and DAUBEN, W. G., *I. Biol. Chem.* (1948), 176, 829.

² FOLCH, J., and VAN SLYKE, D., *Proc. Exp. Biol. Med.*, 41 (1939), 514.

³ HODGE, H. C., MAC LACHAN, P. L., BLOOR, W. R., WELCH, E., KORNBERG, S. L., and FALKENHEIM M., state a fat content of 7%. *J. Biol. Chem.* (1948), 67, 137.

⁴ STETTEN, D. jr., and GRAHL, G. F., *J. Biol. Chem.* 148, 509 (1943).

thick fat sample placed in a dish of 1.2 cm diameter made out 4.8 times the number of counts measured when the infinitely thick fat sample was placed in a micro dish.

In some cases we burnt our samples and compared their activity after converting their carbon into BaCO_3 . In view of the work involved in this procedure (we measured the activity of a very great number of samples) and also because the low carbon content of BaCO_3 we preferred to compare the activity of our samples without converting them into barium carbonate. Total liver fat samples, for example, which were found to contain 65.2 per cent carbon, while the carbon content of barium carbonate amounts to 6.1 per cent only. A burning of a fat sample and the conversion of the carbon obtained into barium carbonate leads thus to a product the activity of which makes out 9.1 per cent only of the activity of fat of the same weight, this figure being increased to 11 when taking into account the reflecting power of barium for the β -rays emitted by the sample.

Results

Some of the results obtained when comparing the ^{14}C content of irradiated mice and that of controls is seen in the following tables.

Table 1

Percentage inhibition by an X-ray dose of 880 r of the incorporation of ^{14}C into purines of desoxyribo-nuclei acid prepared from the liver of suckling rats.

Fraction	Mean value obtained from 55 animals Percentage Change in the Incorporation of ^{14}C due to the Effect of Irradiation
Purines	— 44
Proteins	+ 27

Table 2

Percentage Carbon content ascertained in some of our tissue samples.

Liver fat	65.2
Liver protein	48.8
Intestinal mucosa fat	64.0
Intestinal mucosa protein	47.3

20 mice weighing 21–27 gr were irradiated. Half of these — having an average weight of 23.5 g each — were injected immediately, half after the lapse of 6 hr with 0.15 ml labelled acetate having an activity of 49,200 counts per min. A third group of 10 mice — aggregate weight 238 g — was injected without being irradiated. All mice were killed 1.5 hours after the injection.

We arrived at the figure 49200 stated above by dissolving a known aliquot of the injected acetate in 50 mg of a concentrated sodium acetate solution having the same vapour pressure as the atmosphere at the time of measurement and measuring the activity of the solution. All activity data of the tables 3–6, which contain some of the results obtained, are such of a 50 mg sample. We did not correct for

Table 3

Effects of irradiation on the incorporation of ^{14}C into Tissue Fractions.
Dry Tissue

Organ		Counts/min per mg tissue	Percent of activity injected present in 1 mg tissue $\times 10^3$
Liver	Röntgen I*	3.800	9.10
	Control	3.545	8.50
	Röntgen II**	3.555	8.52
Intestinal mucosa	R I	4.570	10.95
	C	3.930	9.43
	R II	4.110	9.85
Muscles	R I	0.541	1.298
	C	0.430	1.030
	R II	0.434	1.041
Kidney	R I	1.811	4.340
	C	1.554	3.725
	R II	1.571	3.770
Brain	R I	0.769	1.841
	C	0.460	1.101
	R II	0.526	1.261
Plasma	R I	3.845	9.21
	C	3.120	7.48
	R II	3.375	8.09
Bone	R I	0.462	1.108
	C	0.429	1.130
	R II	0.408	0.979

Organ		Percent of activity injected present in 1 mg carbon $\times 10^3$	organ		Percent of activity injected present in 1 mg carbon $\times 10^3$
<i>Total fat</i>			<i>Proteins</i>		
Liver	Röntgen I*	45.4	Liver	Röntgen I*	5.20
	Control	38.6		Control	4.32
	Röntgen II**	53.4		Röntgen II**	4.46
Intestinal mucosa	R I	38.4	Intestinal mucosa	R I	18.16
	C	32.7		C	18.11
	R II	28.9		R II	17.40
Muscles	R I	3.63	Muscles	R I	0.509
	C	5.06		C	0.606
	R II	3.09		R II	0.597
Kidneys	R I	14.9	Kidney	R I	3.90
	C	14.0		C	3.99
	R II	13.0		R II	3.98
Brain	R I	4.55	Brain	R I	0.528
	C	3.36		C	0.509
	R II	3.67		R II	0.615

* Röntgen I = injected 6 hr after irradiation.

** Röntgen II = injected immediately after irradiation.

Table 4.

20 growing mice weighing 9–17 g were irradiated. Half of these (aggregate weight 130 g) injected immediately, the other half after the lapse of 6 hours. A third group (10 mice) injected without being irradiated. Each mouse was injected with 301000 counts per min.

Dry Tissue

Organ		Counts/min per mg tissue	Percent of activity injected present in 1 mg tissue $\times 10^3$
Liver	Röntgen I*	3.35	7.23
	Control	3.47	7.49
	Röntgen II**	2.68	5.78
Intestinal mucosa	R I	3.65	7.88
	C	4.54	9.81
	R II	4.73	10.21
Muscles	R I	0.508	1.098
	C	0.468	1.010
	R II	0.510	1.100
Brain	R I	0.458	0.990
	C	0.422	0.912
	R II	0.698	1.507
Lungs	R I	1.296	2.80
	C	1.290	2.79
	R II	1.362	2.95
Plasma	R I	1.740	3.76
	C	1.800	3.89
	R II	1.995	4.31

* injected 6 hr after irradiation.

** Injected immediately after irradiation.

Total fat and protein

Organ		Percent of activity injected present in 1 mg carbon $\times 10^3$	
		Total fat	Protein
Liver	Röntgen I	53.9	3.92
	Control	54.1	4.15
	Röntgen II	33.8	3.97
Intestinal mucosa	R I	32.3	12.80
	C	39.4	16.75
	R II	38.9	18.76
Muscles	R I	9.58	0.572
	C	4.74	0.605
	R II	3.47	0.543
Brain	R I	3.91	0.446
	C	2.94	0.482
	R II	4.69	0.615
Lungs	R I	19.9	1.570
	C	15.7	1.795
	R II	15.5	2.075
Plasma	R I		5.21
	C		5.77
	R II		6.17

Table 5.

10 mice weighing 11-17 g were irradiated and after the lapse of 24.5 hours injected. The same number of mice injected without being irradiated. Aggregate weight of the 2 groups 140 and 138 g. Each mouse injected with 51,000 counts per min. Killed 90 minutes after injection.

Dry tissue

Organ		Counts/min per mg tissue	Percent of activity injected in 1 mg tissue $\times 10^3$
Liver	R	5.12	6.97
	C	4.46	6.07
Intestinal mucosa	R	7.39	10.06
	C	7.79	10.86
Muscles	R	1.14	1.56
	C	1.02	1.39
Brain	R	1.59	2.16
	C	1.23	1.67
Lungs	R	2.67	3.64
	C	2.13	2.90
Plasma	R	5.26	7.15
	C	3.63	4.94
Plasma extracted with etherealcohol	R	4.07	5.54
	C	2.90	3.96

Total fat and protein

Organ		Percent of activity injected present in 1 mg carbon $\times 10^3$	
		Total fat	Protein
Liver	R	37.2	6.66
	C	40.9	4.62
Intestinal mucosa	R	29.3	20.05
	C	23.3	24.40
Muscles	R	6.70	1.25
	C	7.65	1.01
Brain	R	6.15	1.17
	C	7.20	0.96
Lungs	R	15.3	2.89
	C	20.9	2.51
Plasma	R		10.68
	C		8.38

the different reflecting power of the acetate solution, fat samples and so on. The correction to be employed is very restricted. Furthermore we were interested primarily in a difference of the activity of samples of identical composition, for example of that of liver proteins extracted from irradiated and nonirradiated mice and not in an accurate determination of the retention figures.

Table 6.

10 mice weighing 18–23 g were irradiated and after the lapse of 24 hours injected. The same number of mice injected without being irradiated. Aggregate weight of each group 201 g. Each mouse injected with 38600 counts. Killed 105 minutes after injection.

Dry tissue

Organ		Counts/min per mg tissue	Percent of activity injected present in 1 mg tissue $\times 10^3$
Liver	R	2.455	6.37
	C	2.665	6.91
Intestinal mucosa	R	3.080	7.99
	C	3.530	9.14
Muscles	R	0.387	1.00
	C	0.263	0.68
Kidney	R	1.150	2.98
	C	0.910	2.34
Brain	R	0.328	0.845
	C	0.280	0.724
Plasma	R	2.810	7.28
	C	2.405	6.23

Total fat and protein

Organ		Percent of activity in 1 mg carbon $\times 10^3$	
		Fat	Protein
Liver	R	36.0	3.60
	C	31.2	3.31
Intestinal mucosa	R	29.8	14.72
	C	22.0	14.89
Muscles	R	2.24	0.508
	C	4.64	0.564
Kidney	R	6.42	2.82
	C	9.08	2.49
Brain	R	1.89	0.458
	C	2.39	0.356

The above figures demonstrate the very marked renewal rate of fat carbon especially in the liver and intestinal mucosa, while from the protein fractions those of the intestinal mucosa are far the most active ones.

Experiments of very short duration

As we wished to obtain information on the possible effect of irradiation on the rate of resorption of intraperitoneally injected acetate we killed the mice in a few experiments 5 to 15 minutes only after the injection took place. 0.1

ml of saline containing about 10^5 counts min of labelled acetate was injected to groups of 4 mice. In contrast to all other experiments in these experiments of very short duration food, not however water, was withheld from the mice after irradiation.

As seen in Table 6a the ^{14}C content of the blood of the irradiated and non-irradiated mice does not much differ. By adding to half of the blood secured 0.5 ml of 2-n HCl and drying the blood in vacuo, a process which was repeated, we removed the carbonate content of the blood. In the 5 min. experiments this procedure lead to a diminution of the blood activity by 25 to 27 p.c. for the non-irradiated blood and by 28 to 45 p.c. for the irradiated blood.

The figures of Table 6a do not indicate a depressed resorption after irradiation. Irradiation depressed in these experiments ^{14}C incorporation into liver-fats, in the 5, 15 and 30 min. experiments by 56, 67 and 45 p.c. resp. Liver fat figures show as in the other experiments described very fluctuating values.

Table 6a

Effect of irradiation on mice killed a few minutes after administration of labelled acetate.

Fraction	Counts/min./100 mg dry sample			
	Time of experiment			
	5 min.	15 min.	30 min.	
Blood control	35.7; 31.3	35.5; 36.6; 32.9	34.6	
Blood irr.	35.4; 39.0	35.0; 36.0; 29.9	29.9	
Liver fat control	508; 699	210; 786; 803	473	
Liver fat irr.	167; 306	188; 682; 545	460	
Liver prot. control	— 18.2	— 42.7 —	52.7	
Liver prot. irr.	— 10.2	— 42.4 —	58.5	

Effect of irradiation on suckling rats

The summary of a few experiments carried out with 7 to 14 day old rats which had access to food, except for the 3 min. which irradiation has taken, is seen in Table 7.

Table 7

Percentage Change in the Incorporation of ^{14}C into Protein Fraction of Suckling Rats Due to Irradiation with 880 r.

Number of rats	31	27	28
Liver	+ 27	+ 20	+ 21
Intestinal mucosa..	+ 9	+ 3	—
Kidney	— 2	—	— 20
Muscle	0	— 3	+ 5

which indicates an increased incorporation of ^{14}C into the protein fraction of the liver of suckling rats as observed previously.¹

In an experiment with 34 suckling rats, weighing 40 g, the animals had no access to food for the 4 1/4 hr. which elapsed between injection with acetate and the killing of the rats. Injection took place after irradiation. In this experiment no significant increase in the ^{14}C incorporation into liver proteins of the irradiated rats was observed.

When comparing the figures obtained for suckling rats with those of fully grown mice great differences are observed.

As similar differences were observed when comparing the ^{14}C uptake by young and by adult mice in experiments carried out by Forssberg and one of us, the results of which will be soon published. These first mentioned differences are not mainly due to differences in the metabolic rate of rats and mice, but to a large extent to the fact that in one case we are dealing with rapidly growing, however, in the other case with fully grown animals.

The difference in the pattern of ^{14}C uptake by the proteins of the tissue fractions of outgrown mice and suckling rats is seen in Fig. 2-7 and 8. When plotting the figures the ^{14}C content of 1 mg of protein secured from the intestinal mucosa of control animals was taken to be 100. While as seen in Figs 4 to 7 in the fully grown animal from all protein fractions that of the intestinal mucosa has the largest ^{14}C content, for the rapidly growing rat (cf. Fig. 8) this is no longer the case.

A comparison of ^{14}C uptake by the fatty fractions of the organs of the newly born and of outgrown animals exhibit very pronounced differences as well. While

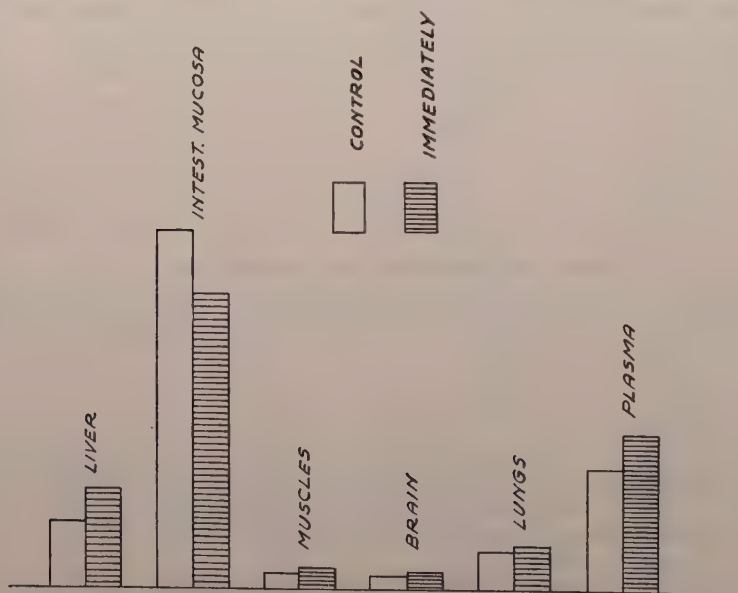


Fig. 4. Uptake of C 14 by 1 mg tissue proteins of irradiated and of control mice 90 min. after intraperitoneal injection of $\text{NaCH}_3^{14}\text{COO}$. (Immediately should read irradiated).

¹ HEVESY, G. *Nature* (1949), 163, 869.

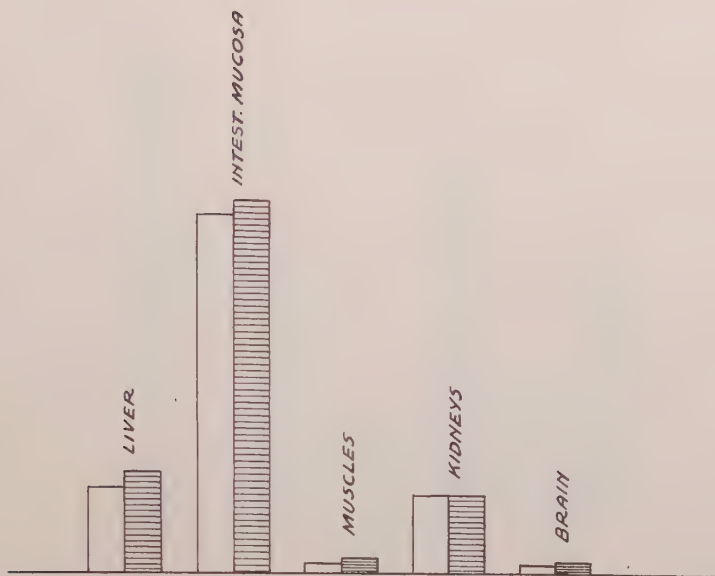


Fig. 5. Uptake of C 14 by 1 mg of tissue protein of irradiated and of control mice 6 hr after irradiation and 91 min after intraperitoneal injection of $\text{NaCH}_3^{14}\text{COO}$.

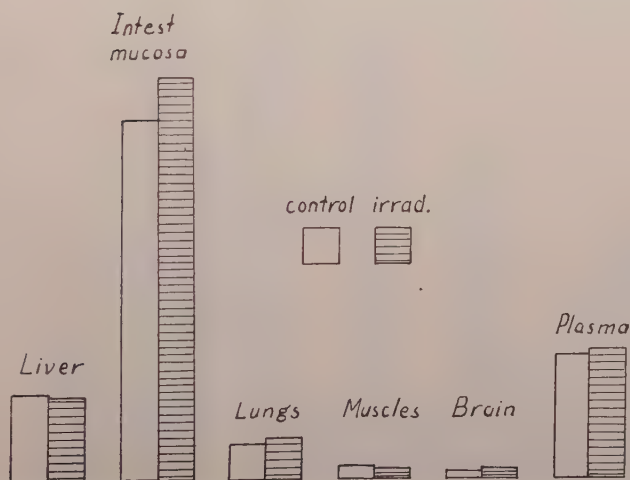


Fig. 6. Uptake of C 14 by 1 mg of tissue protein of irradiated and of control mice 90 min. after intraperitoneal injection of $\text{NaCH}_3^{14}\text{COO}$.

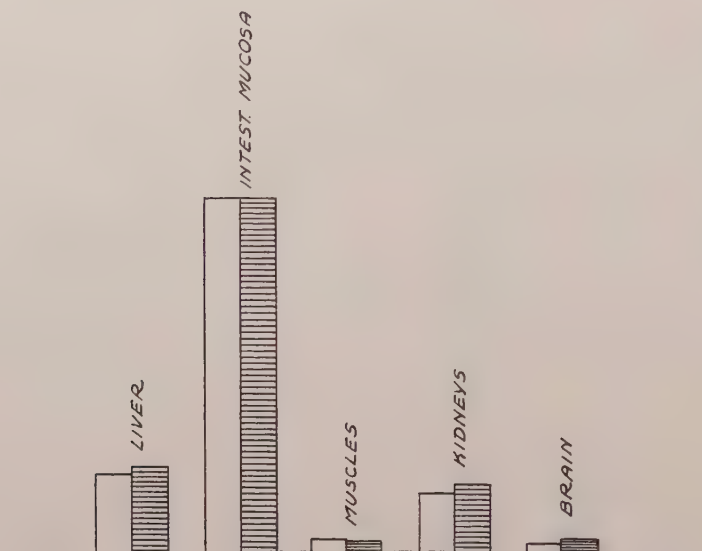


Fig. 7. Uptake of C 14 by 1 mg of tissue proteins of irradiated and of control mice 24 hr after irradiation and 105 min. after subcutaneous injection of $\text{NaCH}_3 \text{}^{14}\text{COO}$.

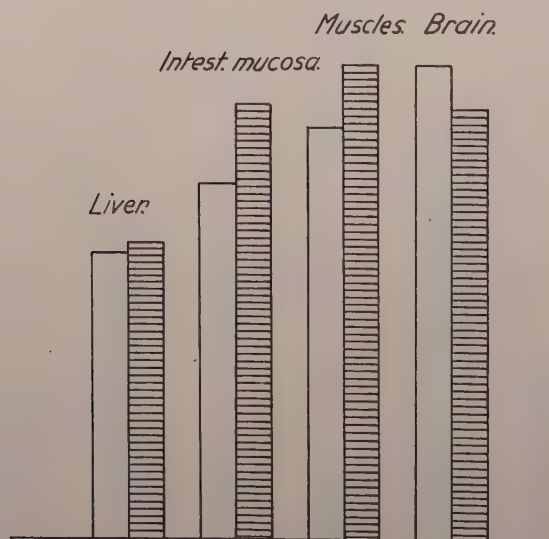


Fig. 8. Uptake of C 14 by 1 mg of tissue proteins of irradiated and of control suckling rats 3 hr after intraperitoneal inj. of $\text{NaCH}_3 \text{}^{14}\text{COO}$.

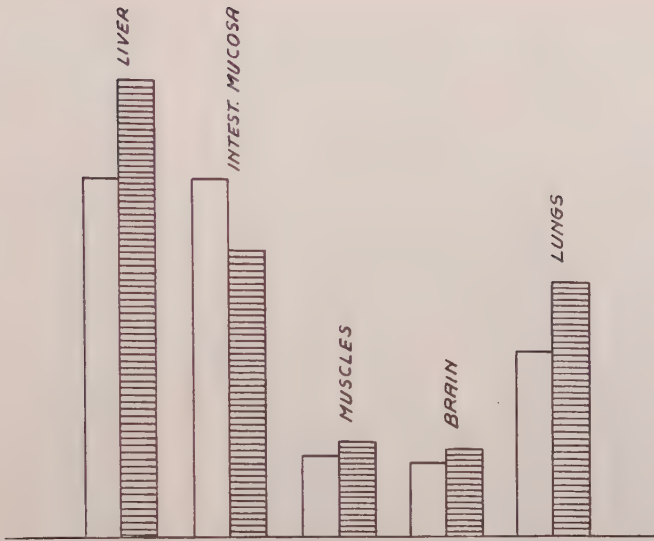


Fig. 9. Uptake of C 14 by 1 mg of total fat extracted from organs of irradiated and of control mice 90 min. after intraperitoneal injection of $\text{NaCH}_3^{14}\text{COO}$.

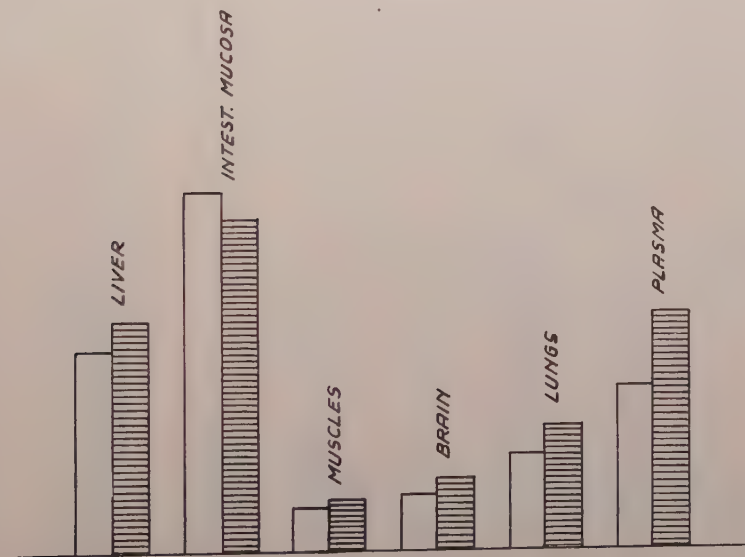


Fig. 10. Uptake of C 14 by 1 mg of dry tissue of irradiated and of control mice 90 min. after intraperitoneal injection of $\text{NaCH}_3^{14}\text{COO}$.

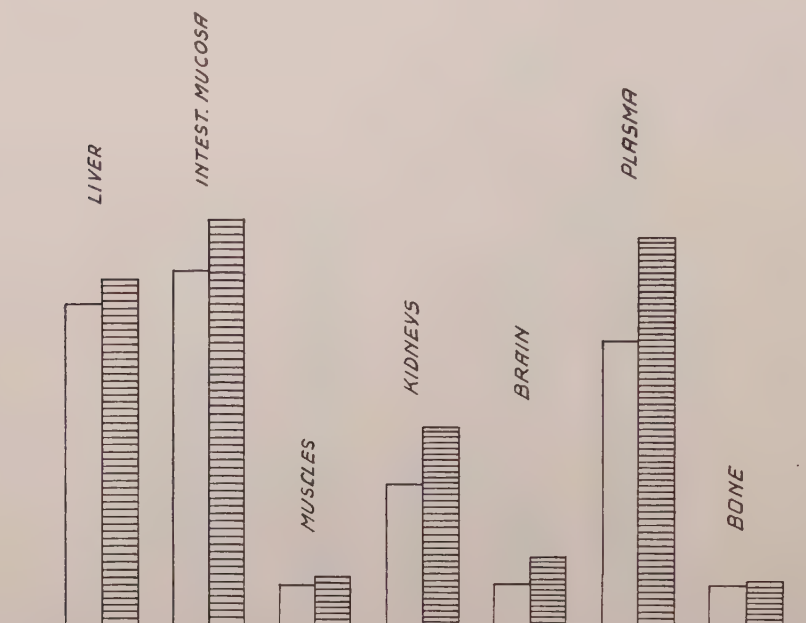


Fig. 11. Uptake of C 14 by 1 mg of dry tissue of irradiated and of control mice 6 hr after intraperitoneal injection of $\text{NaCH}_3 \text{}^{14}\text{COO}$.

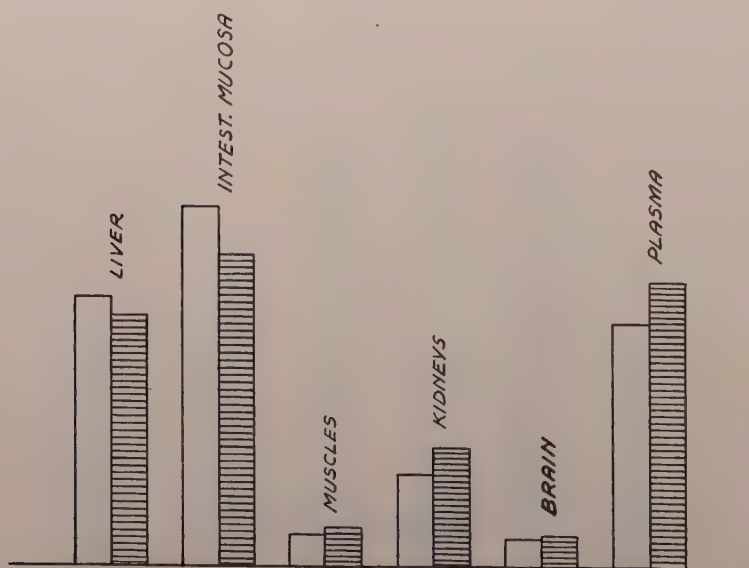


Fig. 12. Uptake of C 14 by 1 mg of dry tissue of irradiated and of control mice 24 hr after irradiation and 105 min after subcutaneous injection of $\text{NaCH}_3 \text{}^{14}\text{COO}$.

Table 8

Percentage change in the ^{14}C uptake by tissue Fraction of fed outgrown mice due to irradiation with 880 r.

Fraction	Liver		Intestinal mucosa		Muscles		Kidney		Lungs		Brain		Plasma	
	% change	mean deviation	% change	mean deviation	% change	mean deviation	% change	mean deviation	% change	mean deviation	% change	mean deviation	% change	mean deviation
Dry tissue	+10.0	± 12.5	+4.6	± 6.1	+9.6	± 8.5	+17.8	± 7.8	+12.0	± 9.1	+33.6	± 10.7	+12.2	± 3.8
Total fats	+4.1	± 6.1	+0.9	± 5.8	+17.6	± 31.3	+5.6	± 7.4			+30.5	± 5.1		
Proteins	+11.9	± 4.8	+1.9	± 4.5	-0.2	± 3.6	+7.0	± 3.7			+16.0	± 6.0		

in the outgrown mouse the ^{14}C content of 1 mg of brain fats amounts to a small percentage only of the corresponding value of the intestinal mucosa fat, in the suckling rat the ^{14}C content of 1 mg of brain fats is higher than that of 1 mg of intestinal mucosa fat, while in the outgrown rat in experiments taking a few hours the ^{14}C content of 1 mg of liver proteins is smaller than that of the liver fats, in the suckling rats the ^{14}C content of 1 mg of liver proteins is larger than that of 1 mg of liver fats.

The great difference in the distribution of ^{14}C between the various tissues of outgrown and rapidly growing animals is also brought out by the Figs 8-13 in which the ^{14}C content of 1 mg of dry tissue is stated. In these as well as in the previous figures the ^{14}C content of the intestinal mucosa is taken to be 100.

The results of the investigation of the effect of irradiation on the C^{14} uptake by tissue fractions of outgrown mice is seen in Table 8. This table does not contain the results obtained in our first experiment carried out with 38 mice in which the ^{14}C content of dry tissue samples alone was compared.¹ In this experiment, the irradiated samples of all tissues took up appreciably more (13 to 106 percent) ^{14}C than the controls.

As seen from Table 8 irradiation increases the mean value found for the rate of ^{14}C incorporation in all the investigated tissue fractions of fed mice except that into muscle proteins. The increase is, however, for most fractions not significant as the mean deviations are very appreciable. A suggestive increase is observed in the three brain fractions ($P = < 0.03$; < 0.005 and < 0.05 and also in the protein fraction of the liver ($P < 0.04$) and in the plasma fraction ($P < 0.03$). The mean value in the percentage change in the ^{14}C uptake by all 17 fractions enumerated in Table 8 works out to be 11.5 the mean deviation of this value to ± 5.3 , thus $P < 0.05$.

As in the investigation carried out by Forssberg and one of us² with mice from which food was withdrawn after the start of irradiation, an increased uptake of ^{14}C by the liver proteins was not observed we have to conclude that the increased incorporation of ^{14}C into the liver proteins of fed mice and possibly also into some other

¹ HEVESY, G. (1949), 164, 269.

² FORSSBERG, A. and HEVESY G., in print.

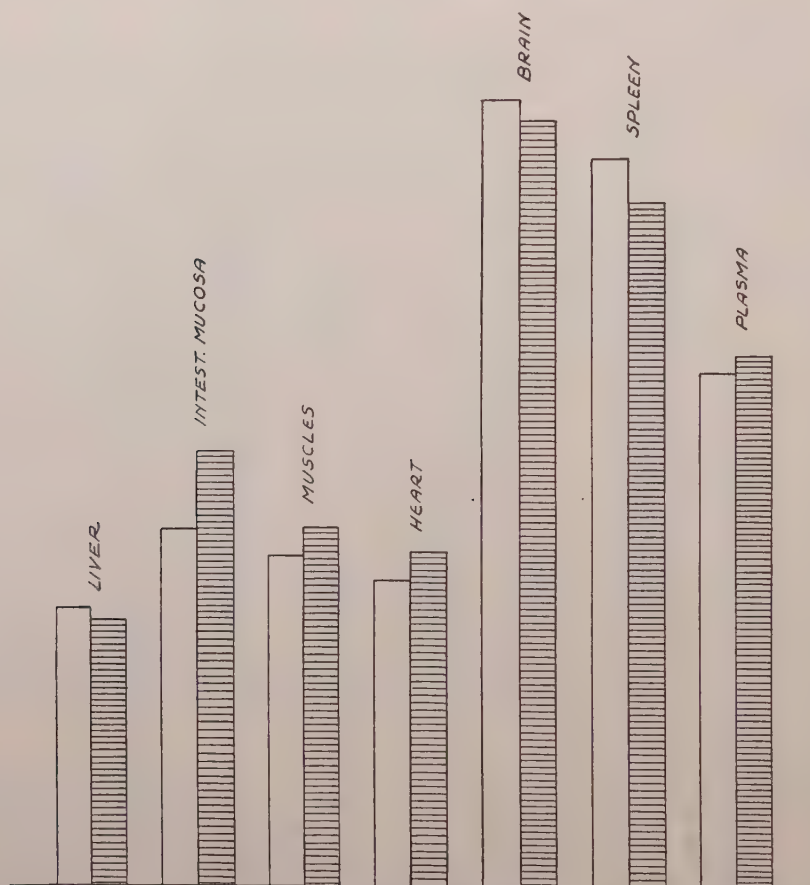


Fig. 13. Uptake of C 14 by 1 mg dry tissue of irradiated and of control suckling rats 3 hr after intraperitoneal injection of $\text{NaCH}_3^{14}\text{COO}$.

tissue fractions is due directly or indirectly to changes produced by irradiation in the digestive tract.

As much of the plasma proteins originates from the liver we have to expect to find higher ^{14}C figures in the plasma proteins of the irradiated mice, which is actually the case. A markedly increased incorporation of ^{14}C the brain phosphatides of rats after administration of labelled glycine was observed by ALTMAN and assoc.¹

SUMMARY

Following intraperitoneal injection of acetate labelled with ^{14}C in the carboxyl group total irradiation of 250 fed mice with 880 r administered in the course of 3 minutes leads to an increase in the mean value of ^{14}C incorporation into total

¹ ALTMAN, K. I., CASARETT, G. W., NOONAN, T. R. and SALOMON, K., Fed. Proc. (1949), 8, No 1.

tissue of liver, intestinal mucosa, muscles, kidney, lungs, brain, and plasma, into total fats of liver, muscles, kidney and brain, into the proteins of liver, kidney and brain of the mice investigated.

Due to the large mean deviations the observed increase is significant to some extent only ($P = < 0.03$; < 0.005 ; < 0.05 ; < 0.04 resp. < 0.03) for the three brain fractions, the liver proteins and the plasma tissue.

We are much indebted to Dr. ARNE FORSSBERG for his cooperation and his very great helpfulness in irradiating the animals used in the experiments described, to Dr. GÖSTA EHRENSVÄRD for preparing the labelled acetate and to Miss GRACE DE ELLIOTT for effective assistance.

The gratitude of the senior author is due to the Knut and Alice Wallenberg Foundation and to the State Research Council for their support of these investigations.

Institute for Research in Organic Chemistry. University of Stockholm.

Tryckt den 5 augusti 1952

Uppsala 1952. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

Thorium B labelled red corpuscles

By E. ALEXANDER¹

With 1 figure in the text

It was recently observed² that thoron (gaseous thorium emanation) when passed through blood decays in the blood and a large part of its solid disintegration products (ThB etc) is found in the red corpuscles.

The aim of the present investigation was to elucidate this labelling process of red corpuscles. The distribution coefficient of ThB between plasma and red corpuscles of rabbit blood was measured under different experimental conditions and it was determined to what extent the ThB which is taken up by the red corpuscles adheres to these corpuscles when they are brought into contact with inactive plasma. This is a point of importance in view of a possible application of ThB labelled red corpuscle in the determination of the total erythrocyte content ("erythrocyte volume") of the body.

Experiments were also carried out on the uptake by the erythrocytes of the active deposit of thorium which is collected in an electric field and dissolved in blood, and also on the uptake of minute amounts of with ThB labelled lead ions added as lead chloride to the plasma. Furthermore the distribution coefficients of labelled lead and labelled bismuth between plasma and red corpuscles were determined by making use of radium D and radium E respectively as indicators.

The activation process

A stream of oxygen was passed for 5 min through 5 cc of freshly drawn heparinized rabbit blood. The velocity of the O₂ stream was 20 cc/min.

The thoron was given off by a radiothor preparation produced according to the technique of O. Hahn (coprecipitation with iron hydroxide). The sample had an activity corresponding to that of 2 mg of radium. It was placed on the bottom of a glass vessel 1.8 cm in diameter and 5 cm in length, corresponding to a volume of 12 cc. The glass vessel was closed by a rubber stopper through which two glass tubes were inserted.

In view of the short life time of thoron ($T = 55$ sec) and the still shorter life time of ThA ($T = 0.145$ sec) no other radioactive substances than ThB and its disintegration products were present in the blood under the conditions of our experiments.

¹ Permanent address: Hebrew University, Jerusalem.

² G. Hevesy, Arkiv f. Kemi, 3, 425 (1951).

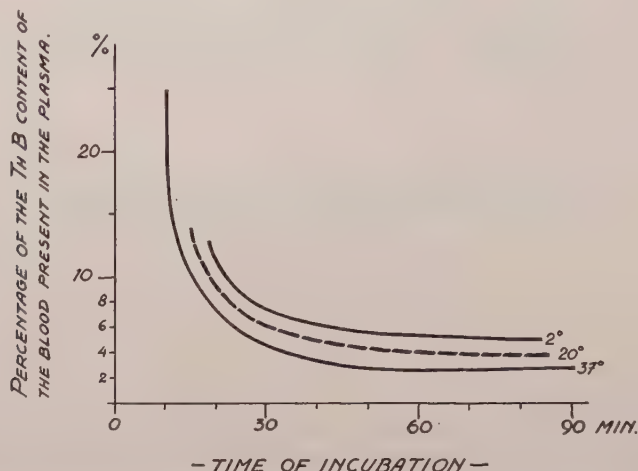


Fig. 1. Percentage of the Th B content of the blood present after different times of incubation in the plasma.

Samples of the activated blood were kept for different times after activation at constant temperature under gentle shaking, the plasma and the blood corpuscles were then separated by centrifugation and dried. The activities of equal amounts (normally 5 mg) of dry substance were compared after the lapse of some hours when the exchange equilibrium between ThB and ThC+C'' is reached. From these figures the activity ratios (5 mg dry plasma: 5 mg dry corpuscles) were calculated. The thickness of our samples was 0.5 mm. As ThB emits soft β rays these and the hard β activity of ThC+C'' and some of its Lactivity is measured in our apparatus (G.-M.-tubes with 2 mg/cm² mica windows).

The ratio of the fresh plasma ThB content to the fresh total blood ThB content was obtained by dividing the above mentioned activity ratios of dry samples by a factor of 2.5 as it was found that the water content of our corpuscles amounted to 69.2 % and that of the plasma to 92.2 %. The ratio corpuscles to plasma was 2/3.

In Fig. 1 are given the results of experiments carried out at 2°, 20° and 37° C. The figures obtained demonstrate that after the lapse of some time the thorium B is almost completely present in the corpuscles. After incubating for two hours at 37° the activity remaining in the plasma amounts only to 2 % of the activity taken up by the corpuscles.

Extent of retention of ThB by the corpuscles

The extent to which ThB adheres to the corpuscles when they are brought into contact with inactive plasma was investigated in the following experiments:

1) Two gm of active corpuscles (obtained by centrifugation of active blood washed twice with physiological saline) were added to 3 gm of inactive plasma (obtained by centrifugation of inactive blood of the same rabbit). This mixture was shaken gently at 37° samples taken at different times after mixing, centrifuged and the activities of corpuscles and plasma compared. The results of this experiment are given in Table I.

Table I

Percentage of ThB given up by the corpuscles to the plasma.

Time after mixing, min	10	20	60	150
ThB ratio in plasma, %	1.4	1.5	1.8	2.0

As demonstrated by these data the activity taken up by the plasma amounts only to 2 %, 98 % of the original activity remaining in the corpuscles.

2) In a second experiment an excess of inactive plasma was added to active blood in such amounts that the ratio plasma/corpuscles was ten times this ratio in normal blood. After addition of the inactive plasma the "distribution coefficients" (Th B content in 1 gm plasma/ThB content in 1 gm corpuscles) of normal and plasma diluted blood were compared. The ratios of these two distribution coefficients are given in Table II.

Table II

Ratio of distribution coefficients of normal/10 × diluted blood.

Time after dilution, min.....	15	30	60	90
Ratio of distr.-coeff.	4.5	3.0	2.5	2.3

From these experiments it can be concluded that the activity given up to the plasma after tenfold dilution amounts to about 7 % of the activity of the corpuscles.

Distribution coefficients of electrically collected ThB deposit, RaD and RaE, and of ThB labelled lead ions

It is well known that the Pb isotopes produced by the decay of emanation in water consist only in part of Pb ions and that an appreciable fraction of the Pb isotopes is present in a colloidal state. In blood which contains large amounts of proteins much of the active lead may be bound to proteins. In a recent investigation by TUPPER *et al.*¹ 94 % of the traces of labelled zinc taken up by the red corpuscles was found to be associated with the proteins.

The experiments described in the following section were carried out with a view to get some information on the state of the lead taken up by the red corpuscles.

1) Distribution coefficients of ThB collected in an electric field

A negatively charged platinum plate, 1.5 cm in diameter, was inserted in the glass-vessel containing the thorium preparation for 24 hours. The active deposit collected on the platinum surface was dissolved in a small volume of diluted nitric acid, the solution evaporated to dryness and taken up with physiological NaCl solution. One half cc of this solution was added to 5 cc of blood. The blood was incubated at 37°, samples taken at different times after addition of the active saline, centrifuged and the activities of plasma and corpuscles compared. The results are shown in Table III.

¹ TUPPER, R., WATTS, R. W. E. & WORMALL, A. (1951). *Biochem. J.* 48 xxxvii.

Table III

Percentage of ThB, collected in an electric field, present in the plasma.

Time after mixing, min	10	25	50	90
Percentage of ThB in plasma	10	3.0	1.1	0.8

It follows from these figures that the blood corpuscles took up an even larger amount of ThB collected in an electric field and dissolved in blood than of ThB produced in the bloodsample by decaying thoron.

2) RaD and RaE distribution coefficients

An experiment was carried out in which instead of ThB + ThC the radioactive isotopes RaD + RaE were added to the blood sample. These daughter products of radon were obtained by treating a glass tube which formerly contained radon with diluted nitric acid. The solution was evaporated, taken up with physiological saline and an aliquot added to 5 cc of blood. The blood was incubated at 37° and samples centrifuged after different incubation times. The results of the activity measurements after 1 day and 32 days are seen in Table IV.

Table IV

Distribution of RaD + RaE between plasma and corpuscles.

Minutes elapsed since the radioactive substances were added to the blood	6	16	26	46	60	105
Activity ratio of dry plasma and dry corpuscles of equal weight measured after the lapse of 1 day (indicating mainly the distribution of RaE (Bi isotope))	7.6	5.2	5.2	4.6	4.0	
Activity ratio measured after the lapse of 32 days (indicating mainly the distribution of RaD (Pb isotope))	0.2	0.12	0.11	0.11	0.12	0.11

Since the lead isotope RaD emits in contrast to the Bi isotope RaE only very soft β rays, it is the radiation of RaE which is measured. Activity measurements in the first days indicate the distribution of RaE (half value time $T = 5$ days) at the time of sampling. After 32 days however RaE reaches exchange equilibrium with its mother product RaD, $T = 22$ years and the figures obtained at this time indicate mainly the RaD distribution at the time of sampling.

As the high RaE content of the plasma prevailing at the time of sampling does not entirely decay in 32 days, this remaining RaE activity has to be subtracted from the activity values measured after 32 days. Due to this fact we have to reduce to activity ratio tissues measured after the lapse of 32 days by about 10 %. Due to the high RaD content of the corpuscles this correction is negligible for the corpuscle phase.

In Table V is listed the percentage of the RaD content of the blood present in the plasma at different times of sampling.

Table V

Percentage of RaD (Pb isotope) present in the plasma.

Minutes elapsed since the radioactive substance was added to the blood ...	6	16	26	46	60	105
Percentage of RaD in the plasma	7.0	4.5	4.5	4.0	4.0	3.8

As demonstrated by the data in Table IV the Bi isotope RaE is not showing the specific concentration of the lead isotopes as shown in Fig. 1 and Tables III and V. By measuring the ThB -ThC activities immediately after activation and again when radioactive equilibrium is reached, it is possible to calculate in this case as well the distribution coefficient of the Bi isotope ThC between plasma and corpuscles in an analogous way to that used in the case of the experiment with RaD + RaE. The data obtained both for RaE and ThC are listed in Table VI.

Table VI

Distribution coefficients of the Bi isotopes RaE and ThC between plasma and corpuscles of the same fresh weight.

Minutes elapsed since the radioactive substance was added to the blood....	6	16	26	35	46	60
Distr.-coeff. of RaE	1.9	1.3	1.3		1.1	1.0
Distr.-coeff. of ThC		2.2	1.4	1.0		

The distribution coefficients listed in Table VI indicate that after the lapse of a short time the Bi isotope content is about the same for the plasma and the corpuscle phase.

3) Distribution coefficient of labelled lead ions

Thorium B is produced by decay of thoron in almost infinitesimal amounts only. To investigate the behaviour of blood corpuscles toward somewhat greater amounts of lead we added small amounts labelled lead to the blood sample. Labelled lead chloride was produced by leading thoron-containing O₂ through diluted nitric acid containing a few mg of PbNO₂. The solution was evaporated to dryness, dissolved in physiological saline and brought to a pH of about 6 by adding traces of a NaOH solution. A part of the active solution was added to freshly drawn blood, resulting in a Pb concentration of 2×10^{-4} equiv./liter blood. After incubating the blood at 37° for different times, the labelled lead was found to be distributed between plasma and corpuscles as seen in Table VII.

Table VII

Percentage of labelled lead ions in the plasma.

Minutes elapsed since the labelled lead was added to the blood	15	25	45	95	165
Percentage of Pb in the plasma, % . . .	43	30	31	30	16

The corpuscles were again found to take up the larger part of the lead, 16 % of the lead remaining however in the plasma, while in the experiments in which ThB was produced in the blood by decaying thoron the corresponding figure was only 2 %. This difference is however not necessarily due to the large difference in the lead concentration in the blood in this experiment. ThB produced in the blood by decay of thoron may be present in the blood in a different chemical state than in this experiment where labelled lead ions were directly introduced into the blood.

I should like to express my gratitude to Prof. G. HEVESY for his unfailing interest and encouragement during the course of this investigation.

SUMMARY

The ThB produced in rabbit blood by decaying thoron is found to be almost quantitatively taken up by the corpuscles. Only 2 % of the total ThB content remain in the plasma phase.

A similar result is obtained when a solution of ThB+C collected originally in an electric field is dissolved in blood. Also the distribution between plasma and corpuscles of RaD obtained from tubes which contained formerly radon was found to be essentially the same.

The uptake of ThB labelled lead by the corpuscle phase was much less pronounced. The ThB content of the plasma phase amounted in this case to 16 % of the total activity of the blood.

The Bi isotopes ThC and RaE show no pronounced preference for the corpuscle phase and are found in about equal amounts in equal weights of plasma and corpuscles.

Institute for organic and biochemistry of the University of Stockholm. Febr. 1952.

Tryckt den 5 augusti 1952

Uppsala 1952. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

Über einige Derivate der Dehydro-Ascorbinsäure

Von HANS HASSELQUIST

Da es bis jetzt nicht möglich war, die Dehydro-Ascorbinsäure in krystallisierter Form zu erhalten, sondern nur als sehr hygroskopische amorphe Substanz gewonnen wurde,¹ war es von Interesse, die Stabilität einiger ihrer Verbindungen mit o-Phenylendiamin und Anilin näher zu studieren. Zur Darstellung der Dehydro-Ascorbinsäure wurde Ascorbinsäure mittels p-Chinon oxydiert. Da es nicht erforderlich war, mit höheren Konzentrationen zu arbeiten, vielmehr schnelle Oxydation erstrebt wurde, versetzte man 1 Mol Ascorbinsäure in wässriger Lösung direkt mit 2 Mol pulverisierten p-Chinons und filtrierte das gebildete Chinhydron ab.² Bei Anwendung höherer Konzentrationen wurde 1 Mol Ascorbinsäure in wenig Wasser gelöst und mit einer ätherischen Lösung von 1 Mol Chinon überschichtet, wobei das entstandene Hydrochinon in die Ätherschicht überging.³

Wie in einer vorhergehenden Mitteilung⁴ gezeigt worden ist, spaltet die Dehydro-Ascorbinsäure in neutraler oder angesauerter Lösung beim Erwärmen CO₂ ab, und zwar rund 1 Mol, um so leichter, je länger die wässrige Lösung bei Zimmertemperatur gestanden hat (unter Aufspaltung des Laktoringes und Bildung der freien Diketogluconsäure).

Die mit Anilin erhaltene Verbindung IV (S. 374) zeigt die gleiche Tendenz zur CO₂-Abspaltung. Dagegen erwies sich die Verbindung mit o-Phenylendiamin I in dieser Hinsicht stabil, was darauf beruhen kann, dass sie beim Erhitzen leichter zu Verbindung II laktonisiert wird als CO₂ abspaltet. Was die Stabilität des Laktoringes der Ascorbinsäure betrifft, so trat eine Aufspaltung des Ringes selbst beim Eindunsten mit konc. Salzsäure nicht ein.⁴

Dehydro-Ascorbinsäure verhält sich in wässriger Lösung anders: HIRST und Mitarb.⁵ haben nämlich gezeigt, dass in derselben innerhalb 300 Stunden Mutarotation eintritt, und in der Lösung konnten 85 % der Dehydro-Ascorbinsäure als freie Säure titriert werden. PENNEY und ZILVA⁶ konnten aus einer solchen Lösung das Ba- und Ca-Salz der L-2,3-Diketo-gluconsäure (= L-2,3-Diketo-gulonsäure) isolieren.

Bei der Kondensation von o-Phenylendiamin mit Dehydro-Ascorbinsäure muss letztere in möglichst frisch-bereitetem Zustand verwendet werden, da andernfalls

¹ P. KARRER, H. SALOMON, R. MORF u. K. SCHÖPP, Biochem. Zs 258, 15 (1933).

² In Analogie mit H. OHLE, Ber. 67, 555 (1934).

³ J. W. PATTERSEN, J. Biol. Chem. 183, 81 (1950).

⁴ H. EULER u. H. HASSELQUIST, Arkiv f. Kemi 4, Nr 7 (1951).

⁵ R. W. HERBERT, E. L. HIRST, E. G. V. PERCIVAL, R. J. W. REYNOLDS & F. SMITH, Soc. 1934, 128.

⁶ J. R. PENNEY & S. S. ZILVA, Biochem. J. 39, 2 (1945)

die Verbindung I nicht gebildet wird. Somit erfolgt zuerst die Kondensation an den beiden Ketogruppen und erst darauf die Ringöffnung. Verwendete man dagegen eine Lösung, welche nur etwa 1 Stunde gestanden hat, so konnte I nicht isoliert werden und aus der Reaktionsmischung fiel kein Reaktionsprodukt aus; vermutlich nimmt der freie Carbonsäurerest an der Reaktion Teil.

Die Verbindung I kann leicht in das Lakton II umgewandelt werden, nämlich durch Kochen mit abs. Methanol, Aceton oder Äthylacetat. Aus den beiden ersteren Lösungsmitteln erhält man praktisch nur II, aus letzterem eine Mischung von I und II. Eine ähnliche Laktonisierung erhielten OHLE und BÖCKMANN⁷ als sie das Osazon von D-Glucosaccharosensäure mit Aceton oder Essigester kochten. Umgekehrt kann die Verbindung II durch Erhitzen mit Wasser leicht in I übergeführt werden. Die Schmelzpunkte der beiden Substanzen erwiesen sich identisch, da I beim Erwärmen leicht laktonisiert wird und unter Gelbfärbung, ohne zu schmelzen in II übergeht.

Der entsprechenden Verbindung II, die OHLE durch Umsetzung von o-Phenylendiamin mit oxydierter Glucosaccharosensäure erhielt, schreibt er eine Bis-chinoxalin-Struktur zu.

Lässt man die Stbst. II mit verd. HCl stehen, so scheidet sich nach einiger Zeit vermutlich eine Chinoxalinverbindung ab und aus dem Filtrat kann freies o-Phenylendiamin isoliert werden. Somit wird 1 Mol Amin abgespalten und im anderen Teil wird der Ringschluss vervollständigt. OHLE erhielt eine ähnliche Verbindung durch Abtrennung des Kondensationsproduktes vom o-Phenylendiamin und der Dehydro-D-glucosaccharosensäure.

I und II konnten durch *vorsichtiges Erhitzen* auf dem Wasserbad leicht zur Verbindung III acetyliert werden. Dagegen entstand aus I, II und III beim Sieden mit Essigsäureanhydrid ein noch weiter acetyliertes Produkt in Form eines Gels, das bisher nicht in kristallinischer Form erhalten werden konnte.

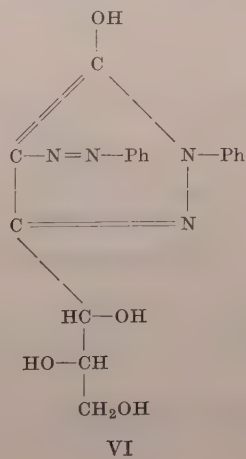
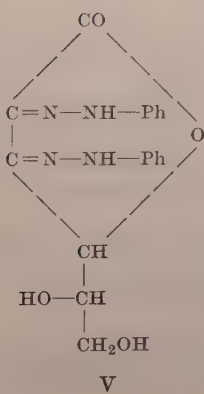
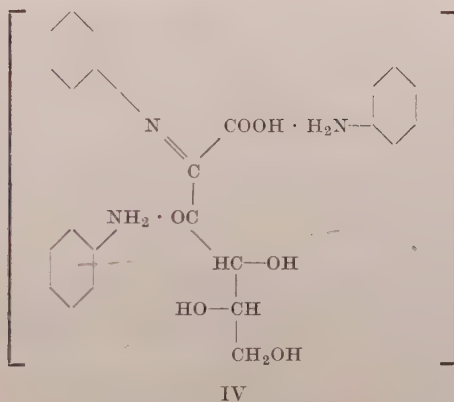
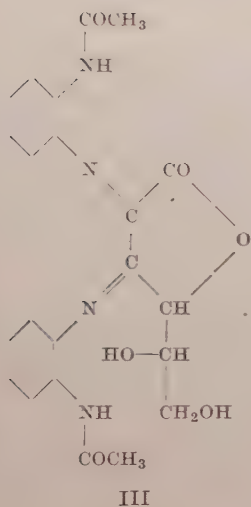
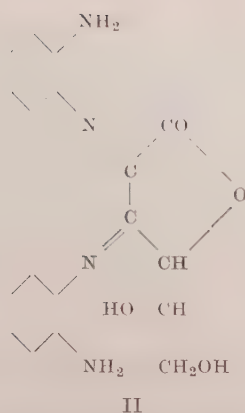
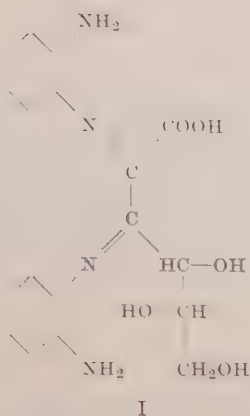
Das entstandene Anilid wird am besten durch die Formel IV dargestellt, denn es spaltet beim Erwärmen in wässriger Lösung CO₂ und Anilin ab und liefert bei milder Acetylierung mit Eissigsäureanhydrid 2 Mol Acetanilid. Das Anilid IV verbraucht in alkalischer Lösung bei 20° 1 Mol Tillmans Reagens (TR). Diese Reaktion kommt zustande durch Enolisierung an den C-Atomen 3 und 4. Die Anilgruppe kann an Kohlenstoffatom 2 oder 3 sitzen.

Dehydro-Ascorbinsäure selbst wird bei 20° in alkalischer Lösung leicht enolisiert (EULER u. HASSELQUIST⁴) und verbraucht dadurch 1 Mol TR. Dies ist der Grund, dass Ascorbinsäure in alkalischer Lösung 2 Mol TR reduziert.

Es erschien auch von Interesse, die Kondensation der gelösten Dehydro-Ascorbinsäure zu verfolgen, an welcher während 3-tägigen Stehens Mutarotation eingetreten war und mit Phenylhydrazin in Reaktion gebracht wurde; es sollte dadurch ermittelt werden ob das dabei erhaltene Osazon sich in seiner Konstitution von denjenigen unterschied, welche aus Ascorbinsäure und Dehydro-Ascorbinsäure gewonnen werden. Es war dies *nicht* der Fall, vielmehr sind alle diese Osazone identisch. PENNEY und ZILVA⁸ zeigten die Identität der entsprechenden 2,4-Dinitro-phenyl-osazone und

⁷ H. OHLE und G. BÖCKMANN, Ber. 67, 1751 (1934).

⁸ J. R. PENNEY a. S. S. ZILVA, Biochem. J. 37, 404 (1943).



grundeten eine kolorimetrische Bestimmungsmethode auf die Farbenreaktion der Osazone mit Alkali.^{9, 10}

Bei der Kondensation von Dehydro-Ascorbinsäure mit Phenylhydrazin zu V wurden auch Versuche nach HIRST und Mitarb.⁵ angestellt; diese Autoren hatten die Reaktion mit einer Dehydro-Ascorbinsäure-Lösung ausgeführt, die sie durch Oxydation mit Jod darstellten und direkt mit essigsaurem Phenylhydrazin kondensierten. Dabei erhielt ich teils etwas rote halogenhaltige Nadeln, teils aus dem Filtrat das halogenfreie Pyrazolon VI. Dieses gab keine Schmelzpunktserniedrigung mit dem nach OHLE⁷ durch direkte Umlagerung des Osazons V mit Alkali erhaltenen Pyrazolon.

Beschreibung der Versuche

Umsetzung der Dehydro-Ascorbinsäure mit o-Phenylen-diamin. Isolierung des Di-o-amino-anils

1,76 g Dehydro-Ascorbinsäure wurden in 10 ml Wasser gelöst, worauf 2,1 g fein-pulverisiertes p-Chinon unter ständigem Rühren zugesetzt wurden. Nach 5 Minuten wurde das gebildete Chinhydron abfiltriert und die Lösung wurde mit 2 g o-Phenylendiamin versetzt. Die Mischung wurde auf dem Wasserbad erwärmt bis alles Diamin in Lösung ging und wurde dann bei 20° längere Zeit gehalten. Durch Reiben mit einem Glasstab wurde das Reaktionsprodukt zur Krystallisation gebracht und fiel nach einigen Minuten plötzlich in Form hellgelber kugeligter Krystallaggregate und einzelner kräftiger gelber Krystalle aus, die sich beim Abscheiden identisch mit II erwiesen.

Es entstand 2,1 g Rohprodukt das bei 148–152° unter Schwarzfärbung schmolz. Umkrystallisiert aus Wasser oder 80 %-igem Methanol, bildete es lange, gelbliche Nadeln, die sich bei 120° (durch Anhydridbildung) gelb färben und bei 180–181° schmelzen.

Die Substanz I ist leichtlöslich in Eisessig und Alkali, und fällt bei Ansäuern daraus unverändert aus; löslich in siedendem Wasser. Über die Umlagerung in wasserfreiem Methanol oder Aceton siehe unter.

Reduziert TR weder in saurer noch in alkalischer Lösung.

Analyse

Ber. für $C_{18}H_{20}O_5N_4$	C 58,06	H 5,42	N 15,08
Gefunden	58,67	5,42	15,33
	58,65	5,40	15,44

Umwandlung der Subst. I in das Lakton II

a) 1,7 g der Subst. I wurden mit 15 ml wasserfreien Methanols 5 Min. auf dem Wasserbad gekocht, wobei die Ausgangssubstanz in Lösung ging und gleichzeitig

⁹ J. R. PENNEY a. S. S. ZILVA Biochem. J. 37, 39 (1943).

¹⁰ Vgl. J. H. ROE, M. B. MILLS, M. J. OESTERLING a. C. M. DIMRON, J. Biol. Chem. 174, 201 (1948).

die Sbst. II in Form stark gelber Nadeln auskrystallisierte. Nach Abkühlung wurde das erhaltene Rohprodukt (1,3 g vom Schmpt. 180-181°) abfiltriert und mit Methanol gewaschen. Nach Umkrystallisieren aus Methanol war der Schmpt. unverändert.

b) 1 g der Sbst. I wurde mit 10 ml Aceton gekocht bis alle Sbst. I in kräftig gelb gefärbte kugelige Krystalle übergegangen war. Das Produkt gab mit II keine Schmelzpunktniedrigung und war somit mit II identisch.

Sbst. II ist löslich in siedendem Methanol, etwas löslich in siedendem Aceton, schwerlöslich in Benzol und in Petroleumäther.

Bei Kochen in Wasser geht die Substanz in Lösung unter Bildung von I (siehe unter).

Analyse

Ber. für $C_{18}H_{18}O_4N_4$ (354,4)	C	61,01	H	5,12	N	15,81
Gefunden		61,54		5,19		16,02
		61,34		5,24		16,20

Molekulargewicht. 85,9 mg Sbst. in 2 108 mg Eisessig gaben eine Gefrierpunktniedrigung von 0,400°.

Mol. Gewicht:	gefunden	397
	berechnet	354

Das höher gefundene Mol.Gewicht kann darauf beruhen, dass die Sbst. eine Tendenz zur Bindung von Essigsäure (Salzbildung) besitzt.

Titration mit NaOH. 43,2 mg Sbst. verbrauchte 1,15 ml 0,1-n NaOH (Phenolphthalein als Indikator) nachdem Sbst. II durch Erhitzen mit Wasser in Sbst. I übergeführt ist.

$$E_{\text{gef.}} = \frac{43,2}{0,1 \times 1,15} = 375$$

$$E_{\text{ber.}} = 354$$

Abspaltung von o-Phenylendiamin aus Sbst. II

300 mg Sbst. II, in 0,6 ml 4-n HCl + 2 ml Wasser gelöst, schieden nach 24 stündigem Stehen hellgelbe grosse viereckige Prismen ab, die bei 190-101° unter Verfärbung schmolzen. Die Sbst. war halogenfrei und enthielt N. Das Filtrat wurde alkalisch gemacht und mit Äthylacetat extrahiert; nach Trocknen und Einengen konnte o-Phenylendiamin daraus isoliert werden.

Umwandlung der Sbst. II in I

1 g des gelben Laktons II wurden mit 5 ml Wasser gekocht bis eine gelbe Lösung entstand. Nach Abkühlung krystallisierten 0,7 g Sbst. aus.

Umsetzung der Sbst. II mit Essigsäureanhydrid (III)

1 g Sbst. II wurde mit 15 ml Essigsäureanhydrid auf dem Wasserbad 5 Min. erwärmt, wobei die gelbe Sbst. in Lösung ging und das Reaktionsprodukt z. T. in Form farbloser Nadeln ausfiel. Nach 15 Min. langem Stehen bei Zimmertemperatur wurde ein gleiches Volumen Benzol zugesetzt und die Krystalle wurden abfiltriert. Das Rohprodukt (1,1 g vom Schmp. 158–159°) schmolz unter Zersetzung. Durch Umkrystallisieren aus Alkohol wurden seidenglänzende Nadeln erhalten, die unter Zersetzung bei 184–184,5° schmolzen.

Die Substanz III ist ziemlich leichtlöslich in Aceton, schwer löslich in Wasser und Benzol.

Analyse

Ber. für $C_{22}H_{22}O_6N_4$	C	60,26	H	5,06	N	12,78
Gefunden		60,19		5,46		13,28
		59,91		5,60		13,22

Das gleiche Acetylderivat wird erhalten wenn die Sbst. I mit Essigsäureanhydrid in den gleichen Mengenverhältnissen wie oben erwärmt wird.

Das Acetylprodukt III lässt sich noch weiter acetylieren, wenn es mit Essigsäureanhydrid bis zur vollständigen Auflösung, ca 10 Min. gekocht wird. Beim Erkalten fällt das neue Reaktionsprodukt noch nicht aus, sondern erst bei Zusatz von Benzol im Überschuss und zwar in Form eines Gels, das nicht in krystallisierter Form erhalten werden konnte.

Umsetzung von Anilin mit Dehydro-Ascorbinsäure IV

1,76 g Ascorbinsäure wurden in 5 ml Wasser gelöst und mit einer Ätherlösung überschichtet, die 1,05 g p-Chinon enthielt. Nach kräftigem Umschütteln während 10 Minuten wurden die wässrige Schicht noch einmal mit Äther ausgeschüttelt. Diese Wasserschicht wurde, ohne vorhergehende Entfernung des gelösten Äthers, unter Umrühren mit 2 ml Anilin versetzt, das dabei in Lösung ging. Durch Reiben der Gefässwände mit einem Glasstab schied sich das Reaktionsprodukt nach ca 3 Min. in Form einer Watte-ähnlicher Masse von Nadeln ab. Nach (im Ganzen) 5 Min. (bei längerer Dauer beginnt eine Zersetzung unter CO_2 -Abgabe und Verharzung der Substanz) wurde abfiltriert und mit wenig Wasser gewaschen; dann wurde die Substanz auf einem Tonteller getrocknet und von unverändertem Anilin befreit. Trockenes Rohprodukt 2,15 g. Beim Umkrystallisieren aus ganz wenig Äther (unter möglichst vollständiger Vermeidung des Erwärmens) erhielt man farblose, prismatische Nadeln vom Schmp. 91–92° (Braunfärbung). Die Sbst. war leichtlöslich in Äther, Aceton, Alkohol, löslich in warmem Wasser (gleichzeitig begann Zersetzung), schwerlöslich in Benzol und in Petroleumäther.

Die Sbst. IV verbraucht TR in alkalischer Lösung (siehe Titration).

Analyse.

Ber. für $C_{12}H_{13}O_6N + 2 C_6H_7N$	C	63,56	H	6,00	N	9,27
Gefunden		63,17		6,01		9,31
		63,26		5,89		9,20

Titration mit TR

a) 6,90 mg Sbst. IV wurden in 2 ml abs. Alkohol gelöst und unter Einleiten von N_2 mit 5 ml 0,2 n NaOH versetzt. Die Mischung wurde unter fortgesetztem Einleiten von N_2 bei Zimmertemperatur mit 0,01 n TR bis zur bleibenden Blaufärbung titriert. Verbrauch: 2,85 ml.

$$E_{\text{gef.}} = \frac{6,9}{0,01 \times 2,85} = 242$$

$$E_{\text{ber.}} = 227$$

b) 15,0 mg Sbst. IV (wie oben) verbrauchten 6,35 ml TR-Lös.

$$E_{\text{gef.}} = \frac{15,0}{0,01 \times 6,35} = 236$$

Acetylierung des Anilides IV mit Essigsäureanhydrid

500 mg Sbst. IV geht bei Zusatz von 0,6 ml Essigsäureanhydrid unter starker Wärmeentwicklung in Lösung. Nach dem Erkalten krystallisiert das Reaktionsprodukt in Form kleiner Tafeln aus. Die Lösung wurde mit 5 ml Wasser verdünnt; nach weiterer Abkühlung wurde das Rohprodukt abfiltriert und mit wenig Wasser gewaschen; es wog 330 mg und schmolz bei 112–115°. Die Sbst. war also identisch mit Acetanilid. Wenn nach Formel IV sich 2 Mol Anilin sich leicht mit Essigsäureanhydrid umsetzen lassen, sollten die 500 mg Sbst. IV 296 mg Acetanilid liefern.

Messung der CO_2 -Abspaltung aus Sbst. IV

100,0 mg Anilid IV in etwas Alkohol gelöst, wurden mit dem gleichen Volumen Wasser versetzt. Im siedenden Wasserbad wurde ein schwacher Stickstoff-Strom durch die Flüssigkeit in eine mit Barytlösung gefüllte Vorlage geleitet. Das darin ausgefällte Bariumcarbonat wurde gravimetrisch bestimmt.

Gefunden 0,0350 g $BaCO_3$, entsprechend 7,80 mg CO_2

1 Mol Sbst. IV, $C_{12}H_{13}O_6N + 2 C_6H_7N$, 1 Mol CO_2 entstpr. 9,7 mg.

Also gef. 0,805 Mol abgespaltenes CO_2 aus 1 Mol Anilid IV.

Umsetzung der Ascorbinsäure, frischer Dehydroascorbinsäure und 3 Tage bei Zimmertemp. vorbehandelter Dehydroascorbinsäure (= L-2,3-Diketo-gluconsäure) mit Phenylhydrazin zu Sbst. V

A.) 850 mg Ascorbinsäure, in 5 ml 30%iger Essigsäure gelöst wurde mit einer Lösung versetzt, die 2,2 g Phenylhydrazin-chlorhydrat in 15 ml 30%iger Essigsäure + Überschuss von Natriumacetat enthielt; die Mischung wurde 45 Min. auf dem Wasserbad erhitzt. Nach Erkalten auf 20° wurde die rote Reaktionslösung mit 200 ml Wasser versetzt, wodurch das Osazon V in Form kleiner roter Nadeln ausfiel. Nach wiederholtem Umkrystallisieren aus Äthylacetat und Alkohol wurde das Osazon rein gewonnen; es schmolz unter Zersetzung bei 215–216°.

B.) Eine Lösung von 850 mg Dehydroascorbinsäure in 5 ml Wasser, erhalten durch Oxydation bei der Darstellung von Sbst. IV wurde im Vakuum von gelöstem Äther befreit und dann mit 15 ml einer Lösung versetzt, welche 2,2 g Phenylhydrazin-chlorhydrat + 1,5 g NaAc enthielt. Die Mischung wurde 1 Stunde auf 40° gehalten. Beim Stehen in Zimmertemperatur bildeten sich kleine, rote Nadeln, die nach Umkrystallisieren aus Äthylacetat bei 215–216° schmolzen.

C.) 5 ml einer wie bei B) gewonnenen Dehydroascorbinsäurelösung stand 3 Tage bei Zimmertemperatur, wobei sich L-2,3-Diketogluconsäure bildete, und wurde wie unter B.) behandelt. Nach Umkrystallisierung des Rohproduktes aus Äthylacetat wurden kleine rote Nadeln vom Schmp. 215–216° erhalten.

Analyse der unter C.) erhaltenen Krystalle

Ber. für $C_{18}H_{18}O_4N_4$	C	61,01	H	5,12	N	15,81
Gef.		59,55		5,09		16,00
		59,47		5,17		15,83

Ein Mischschmelzpunkt der drei Osazonen von A.), B.) und C.) zeigte keine Abweichung von den Schmelzpunkten der einzelnen Osazone, die somit als identisch anzusehen sind.

Umlagerung des Osazons V mit Alkali zum Pyrazolon VI

200 mg Osazon in 20 ml Wasser + 5 ml 2-n Natronlauge wurden auf 75° erwärmt, wobei das rote Osazon mit gelber Farbe in Lösung ging. Durch Ansäuern der abgekühlten Lösung mit Essigsäure fielen gelbe, grünlich fluoreszierende weiche Nadeln aus. Aus denselben entstanden nach Umkrystallisieren aus Methanol gelbe, einen Stich ins gelbrote zeigende Nadeln vom Schmp. 210–211° (unter Zersetzung). Die reine Substanz, die in einer Ausbeute von 110 mg erhalten wurde stimmte vollständig mit der von OHLE beschriebenen überein.

Umsetzung der aus Ascorbinsäure mit 0,1-n Jodlösung dargestellten Dehydroascorbinsäure

Stellt man Dehydroascorbinsäure aus Ascorbinsäure mittels 0,1 n Jodlösung dar ohne darauf folgende Neutralisation der entstandenen HJ nach HIRST u. Mitarb. und erhitzt diese Lösung mit essigsauerm Phenylhydrazin 30 Minuten lang auf 75°, so erhält man eine rote Fällung, die, abfiltriert und mit Wasser gewaschen, sich als halogenhaltig erwies.

Das Filtrat wurde mit einem Überschuss von abs. Alkohol mehrere Tage stehen gelassen, worauf die abfiltrierte rote Fällung nach Waschen mit etwas Alkohol bei 186° schmolz. Nach dreimaligem Umkrystallisieren aus abs. Alkohol erhält man gelbe Nadeln, die bei 208° unter Zersetzung schmolzen und halogenfrei waren.

Ein Mischschmelzpunkt mit Pyrazolon VI erwies die Identität der beiden gemischten Substanzen.

Frau Dr. phil. INGRID LOEPER danke ich bestens für eifrige Hilfe bei den Versuchen.

Stockholm, Universität, Institut für organ.-chemische Forschung.

Tryckt den 26 augusti 1952

Uppsala 1952. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

Selbstdiffusion im Monokalziumferrit

Von J. ARVID HEDVALL, CESARE BRISI¹ und ROLAND LINDNER

Mit 1 Figur im Text

Der Bildungsprozess der Kalziumferrite ist von Interesse sowohl für metallurgische Prozessen wie auch für gewisse Fragen der Zementchemie und ist daher der Gegenstand zahlreicher Untersuchungen gewesen (1, 2, 3, 4).

Zur näheren Kenntnis der Reaktion im festen Zustand ist es nötig, die Diffusionskonstanten der in den Kalziumferriten beweglichen Partikel zu bestimmen. Wir führten die Bestimmung der Selbstdiffusionskonstante von Kalzium und Eisen durch, wobei zunächst das Monokalziumferrit $\text{CaO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$ untersucht wurde.

Die Versuchsmethodik

Das Ferrit wurde durch Reaktion im festen Zustand hergestellt und zu Press-tabletten (von 10 mm Durchmesser und 1,5 mm Dicke) gepresst, die zum Erreichen hoher Dichte getempert wurden.

Die radioaktiven Indikatoren² Ca-45 und Fe-59 wurden dem Diffusionsmedium zugefügt, und die Selbstdiffusion nach verschiedenen Methoden verfolgt, die weiter unten näher beschrieben werden.

Die Präparate

Kalziumkarbonat („Kahlbaum“, gefällt, p. A) und Ferrioxyd („Bakers, Analyzed“) wurden nach Trocknung im äquimolaren Verhältnis gemischt, und die Pulvermischung kurz auf 950° C, dann auf 1150° C erhitzt in mehreren Abschnitten zu je einigen Stunden, jeweils unterbrochen durch Ummörsern).

Die Dichte des Pulvers wurde pyknometrisch zu 4,74 bestimmt (die auf Grund röntgenographischer Bestimmungen berechnete Dichte (5) ist 4,90). Analytisch konnte im Präparat kein freier Kalk nachgewiesen werden.

Das Pulver wurde in einer Handpresse zu Tabletten gepresst, die ca 20 Stunden bei 1150–1180° C getempert und danach einige Stunden auf der Temperatur des jeweiligen Diffusionsversuches gehalten wurden.

Die Dichte der Tabletten lag zwischen 3,9 und 4,2, was einem Raumerfüllungsgrad von 80 bis 86 % entspricht.

¹ Adresse: Istituto di Chimica Generale e Applicata e di Metallurgia, Politecnico di Torino (Italien).

² Geliefert von der Isotope Division des Atomic Energy Research Establishment, Harwell (England).

Bestimmung der Diffusion

Wie seinerzeit zusammenfassend dargestellt (6), gibt es eine grosse Anzahl verschiedener Methoden, die Selbstdiffusion in festen Stoffen zu bestimmen, deren jeweilige Anwendbarkeit durch Faktoren wie die erwartete Grössenordnung der Diffusionskonstante, die Art der radioaktiven Strahlung, den Dampfdruck der Substanz und dergleichen gegeben ist.

1. Die in vorliegender Arbeit hauptsächlich verwendete Methode ist die Bestimmung der Selbstdiffusionskonstante auf Grund der Mengen radioaktiver Substanz, die zwischen einer stark radioaktiven Tablette, und einer mittels einer geeigneten Anordnung in idealem Kontakt dagegen gepressten „inaktiven“ Tablette übergeht (7).

Die Diffusionskonstante in $\text{cm}^2 \text{sec}^{-1}$ ergibt sich aus der übergegangenen Aktivität A in Impulsen/min, der Versuchszeit t in sec, der Konzentration C in Aktivität/ cm^3 und der Kontaktfläche q in cm^2 zu:
$$D = \frac{A^2 \cdot \pi}{t \cdot c^2 \cdot q^2}.$$

2. Im Falle der Diffusion radioaktiven Kalziums (das eine reine, weiche β -Strahlung aufweist) kam auch die Methode der dünnen radioaktiven Schicht (6) zur Anwendung, wobei die Diffusionskonstante aus der im Laufe des Versuches durch Strahlungsabsorption eintretenden Aktivitätsminderung bestimmt werden kann. Hierbei kommt eine andererseits wiedergegebene (6) graphische Darstellung: $A/A_0 = f(\mu \sqrt{Dt})$ zur Anwendung (μ ist der betreffende Absorptions-Koeffizient in cm^{-1}).

Die Ausbreitung der dünnen Schicht wurde durch direkte Bestimmung der Konzentrationsverteilung mittels sukzessiven Abschleifens (8) kontrolliert, wobei die Diffusionskonstante gemäss der Gleichung $D = \frac{x_2^2 - x_1^2}{t \cdot 4 \ln(c_1/c_2)}$ aus der Darstellung $\ln C = f(x^2)$ ermittelt wurde. (x = Abstand von der ursprünglichen Tablettenoberfläche.) Hierbei zeigte sich, wie mehrfach an Sinterkörpern gefunden, dass die Kurve der logarithmischer Darstellung in zwei Geraden aufgespalten werden kann (8), die der Diffusion im Gitter bzw. auf inneren Oberflächen zugeordnet werden können.

Die Versuche und ihre Ergebnisse

Die Erhitzung der Diffusionstabletten geschah in Luft in Rohröfen (Wärmekörper: „Kanthal“-Band auf Sillimanitrohren), deren Effekt mit in Serie geschalteten Eisenwasserstoff-Widerständen konstant gehalten wurde. Die Temperatur der Tabletten wurde (wenn möglich, in unmittelbarer Berührung) mit kalibrierten Pt/Pt-Rh-Thermoelementen gemessen. Der Verlauf der Diffusion wurde bei jedem Versuch durch mehrere Messungen (nach verschiedenen Diffusionszeiten) verfolgt, wozu Zählrohre vom Bell-Typ (General Electric EHM 2) und GM-Verstärker mit 200-facher Untersezung benutzt wurden.

Die Diffusion des radioaktiven Eisens

Es wurde die „Kontaktmethode“ im Temperaturbereich 835 bis 1092° C angewendet. Die Messpunkte sind in der Darstellung $\log D = f(1/T)$ als Kreuze wiedergegeben (Vergl. Fig. 1) und folgen der Beziehung $D = 3,2 \exp(-72\,000/RT)$ $\text{cm}^2 \text{sec}^{-1}$. (In diese Beziehung geht natürlich ein gewisser Anteil an Diffusion auf inneren Oberflächen ein.)

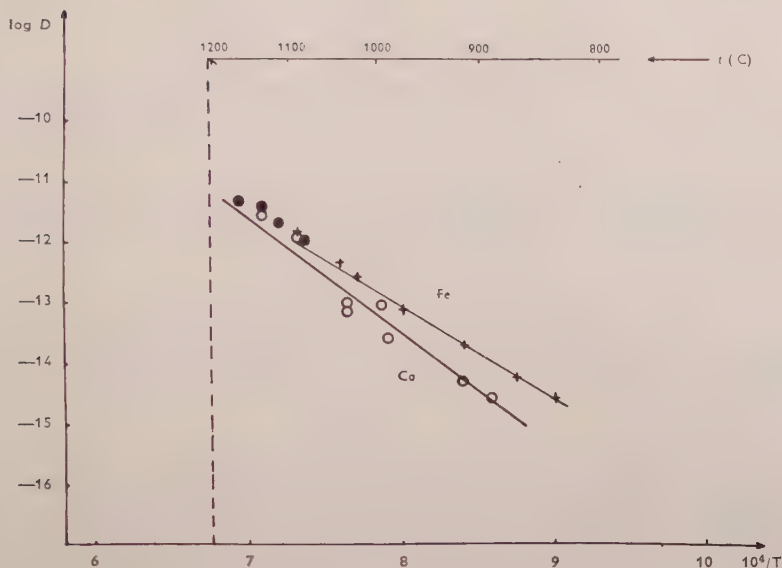


Fig. 1.

Die Diffusion des radioaktiven Kalziums

Mit der Kontaktmethode wurden im Temperaturbereich 890 bis 1140° C Werte erhalten, die in Fig. 1 als offene Kreise wiedergegeben sind. Diese Werte streuen nicht unerheblich, was zum Teil auf Kontaktschwierigkeiten zurückzuführen ist. (Bei einigen Versuchen wurden nämlich die Pastillen mittels Platinplatten kleinen Durchmessers zusammengepresst, was zu plastischer Deformation und unreproduzierbarem Kontakt fühlte.) Infolge der weichen β -Strahlung des Ca-45 konnte bei höheren Temperaturen (der inkongruente Schmelzpunkt des Monokalziumferrits wird zu 1216° C angenommen (9)) auch die Methode der Aktivitätsminderung durch Absorption der β -Strahlung (Ausgangsbedingung: dünne radiative Schicht) benutzt werden. (Die dünne Schicht wurde in Form einer Paste des Oxydgemisches aufgetragen und durch einstündige Erhitzung auf 1050° C zur Reaktion und zum gleichzeitigen Festsintern gebracht.) Die damit erhaltenen Werte sind als gefüllte Kreise in Fig. 1 eingezeichnet und stimmen bei den entsprechenden Temperaturen gut mit den nach der Kontaktmethode erhaltenen Werten überein. Die durch direkte Bestimmung der Konzentrationsverteilung mittels Abschleifen erhaltenen Werte liegen für die Gitterdiffusion etwas niedriger als die β -Absorptionswerte (in denen sich ja auch die Diffusion auf inneren Oberflächen auswirkt), stimmen aber sonst gut mit den übrigen Werten überein.

Der Temperaturverlauf der Diffusionswerte lässt sich in Fig. 1 durch eine Gerade annähern, die der folgenden Beziehung entspricht: $D = 3 \cdot 10^4 \exp(-86\,000/RT)$ $\text{cm}^2 \text{sec}^{-1}$. Die Diffusion des Kalziums zeigt also eine grössere experimentelle Aktivierungsenergie als die des Eisens, was angesichts der kompakten Struktur des Ferrits (5) in erster Linie auf den Grössenunterschied der beiden Ionen zurückgeführt werden könnte.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Selbstdiffusion von radioaktivem Eisen und Kalzium in gesinterten Press-tabletten von Monokalziumferrit wurde gemessen. Die Temperaturfunktionen der Diffusionskonstanten sind für:

Eisen: $D = 3,2 \exp(-72\,000/RT) \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$

Kalzium: $D = 3 \cdot 10^1 \exp(-86\,000/RT) \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$.

Wir danken *Statens Tekniska Forskningsråd* für die Bereitstellung von Mitteln.

Abteilung „Kristallkinetik“, Institut für Silikatforschung, Chalmers Technische Hochschule, Göteborg, Schweden.

LITERATUR. 1. Hedvall, J. A., Sandberg, S. O., *Z. anorg. Ch.* 240 (1938) 16. — 2. Cirilli, V., *Gazzetta Chimica Italiana* 75 (1945) 233. — 3. Konarzewski, J., *Roczniki Chem.* 11 (1931) 607. — 4. Kittel, H., Hüttig, G. F., *Z. anorg. Ch.* 217 (1934) 193. — 5. Burdese, A., *Ricerca Scientifica* 22 (1952) 259. — 6. Lindner, R., Johansson, G., *Acta Chemica Scand.* 4 (1950) 307. — 7. Lindner, R., *J. Chem. Soc.* 1949, 395. — 8. Lindner, R., *Acta Chemica Scand.* 5 (1951) 735. — 9. z. B. Sosman, R. B., Merwin, H. E., *J. Wash. Acad. Science* 6 (1916) 532.

Tryckt den 26 augusti 1952

Uppsala 1952. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

Diffusion von radioaktivem Eisen in Eisen(3)-oxyd und Zink-Eisen-Spinell

Von ROLAND LINDNER

(unter experimenteller Mitarbeit von A. GARCIA-VERDUCH¹ und Å. ÅKERSTRÖM)

Mit 1 Figur im Text

Im Laufe einer grösseren Reihe Untersuchungen von Festkörperreaktionen mittels radioaktiver Indikatoren erschien die Bildung des *Zinkferrits* ($\text{ZnO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$) als Prototyp einer Spinellbildungsreaktion besonders interessant. Eine vorangegangene Mitteilung behandelte die Selbstdiffusion von Zink im Zinkferrit (und im Zinkoxyd) (1); die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Selbstdiffusion des Eisens. Die Diffusion im Ferrioxyd als Ausgangskomponente dieser Spinellbildungsreaktion ist von geringerer Bedeutung bei vorwiegender Diffusionsreaktion als die Diffusion im Reaktionsprodukt Zinkferrit, ist jedoch von grossem Interesse im Zusammenhang mit der Hochtemperaturoxydation von Eisen.

Die Versuchsmethodik

Gesinterte Presstabletten wurden in geeigneter Weise mit dem radioaktiven Indikator² Fe-59 versehen, und die Selbstdiffusion nach verschiedenen weiter unten näher beschriebenen Methoden verfolgt im Temperaturbereich 930 bis 1270° C beim Ferrioxyd und 750 bis 1300° C beim Ferrit.

Die Präparate: Die verwendeten *Zinkeisenspinell*-Präparate sind ausführlich beschrieben worden in erwähnter (1) Mitteilung, auf die hier verwiesen wird.

Als Ferrioxyd kam „Ferric Oxide, Bakers Analyzed“ zur Anwendung. Aus dem Pulver wurden in der Handpresse Tabletten hergestellt (wobei das Anfeuchten des Pulvers die Haltbarkeit der Tabletten erhöht), die nach Trocknung gesintert wurden bei Temperaturen von nahezu 1200° C. Hierbei trat starke Schrumpfung ein (Tablettendurchmesser sank von ca 10 auf ca 8,4 mm), und Tablettendichten von maximal 5,15 (98 % Raumerfüllungsgrad) konnten erzielt werden.

Bestimmung der Selbstdiffusion. Die folgenden Methoden wurden verwendet: 1.) Die sogenannte „*Kontaktmethode*“ (2), bei der die Diffusionskonstante auf Grund geringer Mengen radioaktiver Substanz bestimmt wird, die bei der Versuchstemperatur von einer stark und homogen radio-

¹ Adresse: Instituto Español de Edafologia, Madrid (Spanien).

² Geliefert von der Isotope Division des Atomic Energy Research Establishment, Harwell (England).

aktiv indizierten Tablette auf eine mittels einer geeigneten Vorrichtung (1, 2) in idealem Kontakt dagegen gepresste nichtaktive Tablette „übergehen“. Diese Methode ist sehr empfindlich, es wurden hier damit Diffusionskonstanten bis hinab zu $10^{-15} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$ gemessen. 2.) Die *Methode der radioaktiven dünnen Schicht* (3). Diese Schicht, auf geeignete Weise auf einer Stirnfläche des Probekörpers aufgebracht, diffundiert im Laufe des Versuches in diesen hinein, was zur einer Verminderung der an der Stirnseite gemessenen Aktivität infolge Strahlungsabsorption im festen Stoff führt. Die Ermittlung der Diffusionskonstante erfolgt graphisch (4).

Die Versuche und ihre Ergebnisse

Die Erhitzung der Diffusionstabletten geschah in temperaturregulierten Rohröfen (Wärmekörper aus Alundum, mit Platindraht bewickelt oder aus Sillimanit, mit Kanthaldraht bewickelt). Die Temperatur der Tabletten wurde mit kalibrierten Pt/Pt-Rh-Thermoelementen gemessen. Zur Messung der Radioaktivität dienten Zählrohre General Electric EHM2 und Zählrohrverstärker mit 64-facher bzw. 200- oder 2 000-facher Untersetzung.

Zinkeisenspinell. Die an diesem System erhaltenen Werte sind als zur oberen Kurve gehörig in Fig. 1 wiedergegeben. Die mit der Kontaktmethode erhaltenen Werte (Kreise) stimmen ausreichend mit denen mit der Methode der aktiven dünnen Schicht erhaltenen (Kreuze) überein. Bei letzterer Methode war folgendes zu beachten: Fe-59 weist (ausser der verhältnismässig weichen β -Strahlung) eine γ -Strahlung auf, die sich in unseren Zählrohren mit etwa 4 % der Gesamtstrahlung bemerkbar machte.

Diese Strahlung wird nicht nennenswert durch den Diffusionsverlauf beeinflusst und ist daher — nach gesonderter Ermittlung mit aufgelegter Absorptionsfolie — von der jeweiligen Gesamtaktivität abzuziehen, wonach die β -Aktivität und ihre Verminderung im Laufe der Diffusion ermittelt werden kann (1).

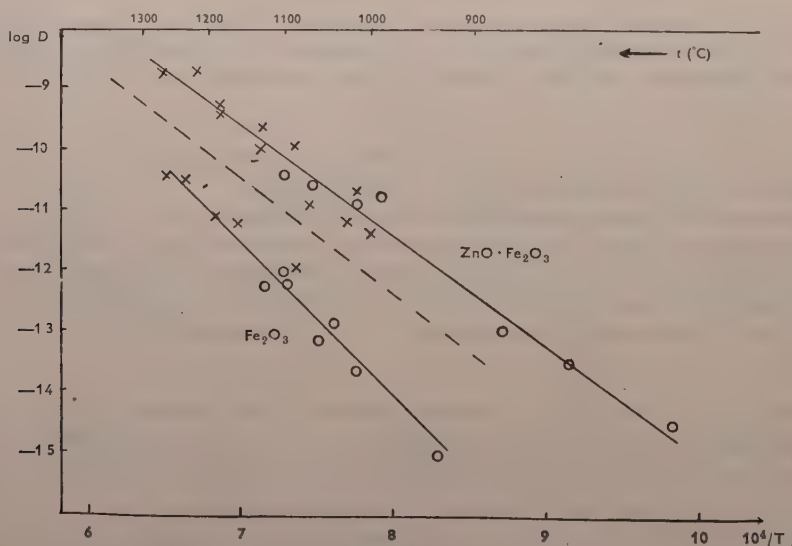


Fig. 1.

Die Aufbringung der dünnen radioaktiven Schicht geschah auf folgende Arten: erstens durch Ausfällung auf der Tablettenoberfläche aus radioaktiver Eisenchloridlösung und Ammoniak und anschliessende Trocknung des ausgefallenen Hydroxyds und Glühung zu Ferrioxyd; zweitens durch Reaktion einer dünnen Pulverschicht von Ferrioxyd und Zinkoxyd auf der Tablettenoberfläche (etwa 1 Stunde bei 1000–1100° C), wobei der entstehende aktive Spinell auf der Tablettenoberfläche fest-sintert. Beide Methoden lieferten übereinstimmende Resultate.

Die Summe der Messwerte lassen sich durch folgende Temperaturfunktion der Diffusionskonstante wiedergeben (in Fig. 1 als die obere Gerade logarithmisch dargestellt):

$$D = 8,5 \cdot 10^2 \exp (-82\,000/RT) \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}.$$

Ferrioxyd. Die Messwerte gehören zu der unteren Kurve in der Darstellung der Fig. 1. (Auch hier beziehen sich Kreise auf nach der Kontaktmethode, Kreuze auf nach der Methode der dünnen Schicht erhaltene Werte.) Die dünne Schicht wurde durch Aufsintern radioaktiven Ferrioxys hergestellt. Die Übereinstimmung zwischen den beiden Methoden ist geringer als beim Spinell, der Temperaturverlauf der Diffusionskonstante durch weniger Messungen belegt. Er kann annähernd durch die Gleichung beschrieben werden:

$$D = 4 \cdot 10^4 \exp (-112\,000/RT) \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}.$$

In kurzer zusammenfassender Betrachtung der Ergebnisse lässt sich folgendes feststellen:

Die Diffusionskonstante des Eisens im Zinkeisen-spinell liegt im untersuchten Temperaturbereich etwa eine Zehnerpotenz höher als die des Zinkes (1) (gestrichelte Linie in Fig. 1), wie dies verschiedentlich erwartet worden ist (5); die experimentellen Aktivierungsenergien sind beinahe die gleichen.

Die Diffusionskonstante des Eisens im Eisenoxyd liegt im untersuchten Temperaturbereich erheblich tiefer und erfordert nach den vorliegenden Messungen eine ungewöhnlich hohe experimentelle Aktivierungsenergie. (Eingehende Messungen sind im Zusammenhang mit einer Untersuchung des Mechanismus der Eisenoxydation geplant.) Dies steht in Übereinstimmung mit der Tatsache, dass gerade dieses Eisenoxyd sich bei der Eisenoxydation in verhältnismässig sehr dünner Schicht und erst bei höheren Temperaturen (> 900° C) bildet (6). (Es besteht allerdings ein gewisser Widerspruch zu dem Befund (7), dass die Bildung des Ferrioxys einer linearen Zeitfunktion gehorcht, was voraussetzt, dass die entsprechende Diffusionskonstante gross ist verglichen mit der Geschwindigkeitskonstante der Phasengrenzreaktion.)

Schliesslich soll darauf hingewiesen werden, dass bei allen Versuchen an Pres-tabletten ein gewisser Anteil an Diffusion auf Grenzflächen vorliegt (der sich im allgemeinen hauptsächlich in einer Erhöhung des präexponentiellen Faktors der Diffusions-Temperatur-Funktion bemerkbar macht) und dass hier noch nichts über die Abhängigkeit der Diffusion von der kristallographischen Richtung ausgesagt werden kann.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Diffusion von radioaktivem Eisen in gesinterten Presstabletten von Zink-Eisen-Spinell sowie Ferrioxyd wurde gemessen. Als Temperaturfunktion der Diffusionskonstanten wird angegeben für:

$$\text{Zink-Eisen-Spinell: } D = 8,5 \cdot 10^2 \exp(-82\,000/RT) \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1},$$

während für Ferrioxyd nach den bisherigen Messungen folgender Wert wahrscheinlich scheint:

$$D = 4 \cdot 10^4 \exp(-112\,000/RT) \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}.$$

Herrn Prof. J. A. Hedvall sei für sein Interesse an der Untersuchung, Statens Tekniska Forskningsråd für die Bereitstellung von Mitteln bestens gedankt.

Abteilung „Kristallkinetik“, Institut für Silikatforschung, Chalmers Technische Hochschule, Göteborg, Schweden.

LITERATUR. 1. Lindner, R., *Acta Chemica Scand.* 6 (1952) 357. — 2. Lindner, R., *J. Chem. Soc. London* 1949, 395. — 3. de Hevesy, G., Seith, W., *Z. Physik* 56 (1929) 790. — 4. z. B. Lindner, R., Johansson, G., *Acta Chemica Scand.* 4 (1950) 307. — 5. Hüttig, G. F., Ehrenberg, M., Kittel, H., *Z. anorg. Chem.* 228 (1937) 112. Jander, W., Stamm, W., *Z. anorg. Chem.* 199 (1931) 165. Jander, W., Hoffmann, E., *Z. anorg. Chem.* 202 (1931) 152. Schröder, W., *Z. El. Chem.* 48 (1942) 301; 49 (1943) 38. — 6. Bénard, J., Coquelle, O., *Comptes rend.* 222 (1946) 796. — 7. Bénard, J., Coquelle, O., *Comptes rend.* 222 (1946) 884. — 8. Lindner, R., *Acta Chemica Scand.* 5 (1951) 735.

Tryckt den 26 augusti 1952

Uppsala 1952. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

Selbstdiffusion im Bleioxyd

Von ROLAND LINDNER

Mit 1 Figur im Text

Die Kenntnis der Selbstdiffusion in festen Stoffen ist nötig für die eingehende Untersuchung von Festkörperreaktionen. Im Laufe eines grösseren Arbeitsprogrammes wurde auf der hiesigen Abteilung als erstes Beispiel seinerzeit (Ende 1947) die Diffusion von radioaktivem Blei in Bleioxyd (PbO) untersucht.

Die Versuchsmethode. Reines Bleioxyd wurde nach dem Vorgang von COHEN und ADDINK (1) hergestellt und zu Tabletten gepresst, die zwecks Erreichen möglichst hoher Dichte getempert wurden. Als radioaktiver Indikator wurde ThB (Pb-212) verwendet, das aus der „Emanation“ eines „hochemanierenden“ Radiothoriumpräparates (nach O. HAHN) an einem elektrisch geladenen Platinblech niedergeschlagen worden war. Zwecks Herstellung von homogen radioaktiv indiziertem Bleioxyd wurde eine annähernd neutrale Lösung von ThB der Lösung des inaktiven Bleinitrates vor der Ausfällung mit Kalilauge zugefügt.

Die Bestimmung der Selbstdiffusion stiess anfänglich auf Schwierigkeiten aus folgenden Gründen:

Die sich bis dahin bietenden Methoden basieren hauptsächlich auf der durch Diffusion eintretenden Ausbreitung einer ursprünglich sehr dünnen, auf der Stirnseite des Probekörpers aufgetragenen Schicht.

Diese Ausbreitung und damit die Diffusion kann am einfachsten verfolgt werden auf Grund der Abnahme der auf der Stirnseite gemessenen Radioaktivität als Folge der zunehmenden Strahlungsabsorption im festen Körper (2). Hierzu muss jedoch die Diffusionskonstante einen gewissen Mindestwert aufweisen entsprechend der Dauer des Versuches und dem Absorptionskoeffizienten der betreffenden Strahlung. Für α -Strahlung liegt dieser Wert bei etwa $10^{-12} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$, während die sehr empfindliche Methode der Rückstossstrahlung erst bei einer Diffusionskonstante *unterhalb* $10^{-14} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$ angewendet werden kann (2, 3).

Ausserdem darf die dünne radioaktive Schicht sich nicht durch andere Vorgänge als Diffusion verändern wie z. B. Verdampfung oder andere Oberflächenvorgänge.

All dies ist beim Bleioxyd schlecht erfüllt: Die Diffusionskonstante schien nach orientierenden Vorversuchen recht klein, die Verdampfungsgeschwindigkeit bei höheren Temperaturen dagegen erheblich (4); ausserdem muss innerhalb eines grossen Temperaturintervalles (5) mit der Gefahr der Oxydation zu Pb_3O_4 gerechnet werden,

der wir durch Verwendung von hochgereinigtem Stickstoff (bzw. Vakuum) zu begegnen suchten.

Ein befriedigende Versuchsmethodik ergab sich jedoch auf Grund einiger bei Vorversuchen gemachten Beobachtungen:

Zur Verminderung von Verdampfungsverlusten der dünnen radioaktiven Schicht waren in einigen Versuchen je zwei Tabletten mit verschiedenen stark aktiven Schichten aufeinander gelegt worden. Nach entsprechender Erhitzung verteilte sich die Aktivität gleichförmig auf die beiden Tabletten. Der Gedanke lag nahe, derartige Erscheinungen zur Messung der Selbstdiffusion auszunützen. Am aussichtsreichsten erschien es, eine homogen indizierte, stark radioaktive Tablette gegen eine inaktive zu pressen und nach erfolgter Erhitzung und Diffusion die „übergegangene“ Aktivität zu bestimmen. Dieser Gedanke, in geeigneter Ausführung als „Kontaktmethode“ zur Messung der Selbstdiffusion bezeichnet (3), (derartige Anordnungen zur Untersuchung der Fremddiffusion in Metallen sind in der Literatur beschrieben) erwies sich von überraschend grosser Anwendbarkeit, und es ist seitdem auf diese Art die Selbstdiffusion in so verschiedenen Stoffen bestimmt worden wie in: PbO , PbJ_2 , $\text{PbO} \cdot \text{SiO}_2$, $2 \text{ PbO} \cdot \text{SiO}_2$, Ag_2SO_4 , ZnO , $\text{ZnO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$, Fe_2O_3 , CaO , $\text{CaO} \cdot \text{SiO}_2$, $\text{CaO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$, $\text{BaO} \cdot \text{TiO}_2$.

Die Anwendbarkeit der Methode ist gegeben durch die Notwendigkeit guten Kontaktes *ohne* zu weit gehende Rekristallisation, die infolge Verschweissens die Trennung der Tabletten unmöglich macht: der entsprechende Bereich liegt etwa bei Diffusionskonstanten von 10^{-15} – $10^{-12} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$, „deckt“ also u. a. gerade die Lücke, die zwischen den Anwendungsbereichen von α -Absorptions- bzw. Rückstoss-methode klafft (2).

Die Versuche und ihre Ergebnisse. Die Sintertabletten aus aktivem bzw. inaktivem Bleioxyd wurden in einem Pastillhalter (andererorts (6) näher beschrieben) zusammengepresst und auf die Diffusionstemperatur erhitzt. Temperatur und elektrische Leitfähigkeit (zur Kontrolle ausreichenden Kontaktes zwischen den Tabletten) wurden mittels Platinplatten kontrolliert, die die Tabletten zusammenhielten und als heisse Lötstellen von Thermoelementen ausgebildet waren. Die Erhitzung geschah in mit Chromnickelband bewickelten Schliffrohren aus Supremax- oder Quarzglas in hochgereinigtem Stickstoff oder im Vakuum. Die Temperatur wurde mit Effektregulierung durch Eisen-Wasserstoff-Widerstände auf $+2^\circ \text{ C}$ konstant gehalten.

Jeder Diffusionsversuch wurde gleichzeitig mit mehreren Tablettpaaren durchgeführt und die zeitliche Konstanz des Diffusionskoeffizienten durch wiederholte Messungen nach verschiedenen Versuchszeiten kontrolliert.

Durch Vergleich mit einem ThB-Präparat wurden alle Messungen auf den radioaktiven Zerfall des ThB und auf etwaige Schwankungen im Wirkungsgrad der Zählapparatur korrigiert; ausserdem wurde stets die Einstellung des radioaktiven Gleichgewichts zwischen ThB und ThC abgewartet. Die Messungen geschahen mittels handelsüblicher Zählrohre und Zählrohrverstärker. Die anfängliche Aktivitätskonzentration des aktiven Bleioxyds lag in der Grössenordnung von 10^4 Impulsen/min und mg.

Die erhaltenen Werte der Diffusionskonstanten sind in der Figur 1 zusammengefasst in logarithmischer Darstellung als Funktion der absoluten Temperatur.

Die Messwerte gruppieren sich um eine Gerade, die dem Ausdruck:

$$D = 10^5 \exp (-66\,000/RT) \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$$

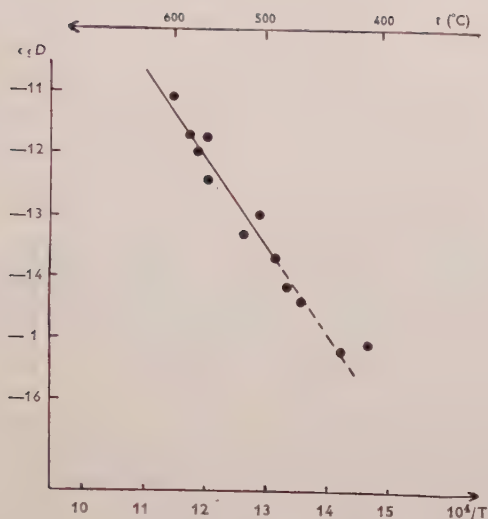


Fig. 1.

entspricht. Diese Linie ist in der Figur unterhalb des Punktes der Umwandlung $\text{PbO}_{\text{rot}} \rightleftharpoons \text{PbO}_{\text{gelb}}$ (488°C) gestrichelt weitergegeben. Es sind Versuche zur Festlegung des Verlaufes der Temperaturfunktion unterhalb des Umwandlungspunktes (hauptsächlich nach der Methode der Absorption von Rückstossstrahlung) durchgeführt worden, die indessen zu keinem eindeutigen Resultat bezüglich einer etwaigen Änderung der Temperaturfunktion infolge einer Umwandlung geführt haben (wenngleich bei tieferen Temperaturen eine geringere experimentelle Aktivierungsenergie vorzuliegen scheint).

ZUSAMMENFASSUNG

Eine in ihrer Anwendung auf die Messung der Selbstdiffusion in festen Stoffen neue Methode wurde bei der Messung der Diffusion von radioaktivem Blei in Bleioxyd eingeführt. Für gesinterte Presstabletten von gelbem Bleioxyd PbO zeigt die Diffusionskonstante annähernd den folgenden Temperaturverlauf:

$$D = 10^5 \exp(-66\,000/RT) \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}.$$

(Die Fehlergrenze bei der Bestimmung der experimentellen Aktivierungsenergie wird zu nicht viel geringer als 10 % abgeschätzt; beim präexponentiellen Faktor ist sie naturgemäss erheblich grösser.) Die Werte enthalten naturgemäss einen gewissen Anteil an Diffusion auf Grenzflächen (7) und lassen — an einem Kristallitengemenge gemessen — keine Aussagen über die Diffusion in verschiedenen kristallographischen Richtungen zu.

An der Durchführung der Versuche beteiligte sich Ing. P. LÖWENHARD.

Herrn Prof. J. A. HEDVALL danke ich für sein Interesse an der Untersuchung, *Statens Tekniska Forskningsråd* für die Bereitstellung von Mitteln.

Abteilung „Kristallkinetik“, Institut für Silikatforschung, Chalmers Technische Hochschule, Göteborg, Schweden.

LITERATUR. 1. E. Cohen, N. W. H. Addink, Z. phys. Chem., A 168 (1934) 188. — 2. de Hevesy, G., Seith, W., Z. Physik 56 (1929) 790. — 3. Lindner, R., Johansson, G., Acta Chemica Scand. 4 (1950) 307. — 4. Hedvall, J. A., Jagitsch, R., Z. anorg. Chem. 262 (1950) 49. — 5. Le Blanc, M., Eberius, E., Z. phys. Chem. 160 (1932) 101. — 6. Lindner, R., J. Chem. Soc. 1949, 395. — 7. Lindner, R., Acta Chemica Scand. 5 (1950) 735.

Tryckt den 26 augusti 1952

Uppsala 1952. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

Some contributions to the question of crystallographic transition and crystal cracking

By J. ARVID HEDVALL and OLOF CARLANDER

With 9 figures in the text

A great number of solid substances change their crystal structures at temperatures which are generally as sharply defined as their melting points. But in most cases the transition velocity is much slower than the melting process, which is probably caused by the lower degree of mobility of the lattice particles at the transition temperature. Occasionally these temperatures are not quite sharply defined. Organic chemistry shows many examples of compounds with relatively large transition intervals.

The transition velocity is a very individual property and generally varies according to the direction. The change from the low temperature modification into the structure which is stable at higher temperatures, often occurs more rapidly than the reverse process. As instances may be mentioned the transitions $S \rightleftharpoons S$ and α -quartz

rhomb. monocl.

$\rightleftharpoons$ cristobalite. In many cases the velocity seems to depend on the structural difference between the two modifications, and on the mechanism of these phenomena. Very little research has been done in spite of their great importance, for instance in many branches of applied chemistry.¹ The investigations made by SHOJI, BERNAL, DEHLINGER and HARTSHONE may, however, be mentioned in this connection.²

One of the principal results from the investigations of the reactivity of solids is the general rule that the activity of a solid substance has a relative maximum during the period when any kind of change occurs in its lattice structure.³

In later investigations FRICKE and his collaborators established that such states of imperfect structure, not, of course, corresponding to equilibria, are characterized by a considerable surplus of energy.⁴ Further research showed that the reactivity rule holds true even for non-structural changes of the lattices, e.g. variations of the magnetic, electric or irradiation states.⁵

In the reaction velocity formula

$$K = A \cdot e^{-\frac{q}{RT}},$$

¹ J. A. HEDVALL: Reaktionsfähigkeit fester Stoffe (Ambrosius Barth, Leipzig 1938 and Edward Brothers, Ann Arbor 1943); Einführung in die Chemie der Feststoffe (Vieweg & Sohn, Braunschweig 1952).

² H. SHOJI: Z. Krist. 77 (1931), 381; J. D. BERNAL: Trans. Faraday Soc. 34 (1938), 834; U. DEHLINGER: Z. Phys. 116 (1940), 576; N. H. HARTSHONE: Disc. Faraday Soc. 5 (1949), 149.

³ J. A. HEDVALL: Op. cit. p. 141.

⁴ R. FRICKE and P. ACKERMANN: Z. Elektrochem. angew. phys. Chem. 40 (1934), 630.

⁵ J. A. HEDVALL: Op. cit. p. 162.

A is a factor depending on the geometrical and crystallographic properties of the solid (size and crystallographic type of the contact surfaces), R is the gas constant, and T the temperature in $^{\circ}K$; q is the energy of loosening up of the lattice, and consequently defines the mobility of the particles.

K will increase with increasing values of A and T , and with decreasing values of q . Variations of q will obviously have greater effect than variation of A . The value of q is generally smaller for the surface particles than for those in the interior of the lattice, i.e., the surface particles are more effective carriers of matter than those inside, which in all directions are surrounded by saturated particles. In other words, the rate of diffusion is higher at the surfaces than in the interior of a perfectly developed lattice.

If in crystals there should occur imperfections which do not correspond to equilibria, they facilitate the inner diffusion. Such states occur not only during a change of crystallographic modification but also during ageing processes.

The first stage of a reaction in systems in which a solid is in contact with another solid, or with liquid or gaseous phases, is a rapid phase boundary reaction, resulting in a very thin adsorption or reaction film. The velocity of the continued reaction — the second stage — depends on the transport conditions from the interior of the lattice and through the layer of the reaction product. The velocity of this part of the reaction (diffusion) is much lower.

It is evident that the increased yield of a reaction — at constant temperature — with decreasing grain size is caused not only by the geometrically increased contact surface between the reaction particles, but also by the number and activity of the surface particles per unit of mass. If it were possible to grind the grains to the size of a few molecules the reaction would no doubt take a very rapid course, just as the formation of adsorption films. Even the finest grinding, however, gives grains such that the slower second stage of the reaction, i.e. the supply of reactive particles from the interior, generally determines the velocity. It is also evident that this process must be facilitated by any kind of loosening up of the lattices in question. Crystallographic transition processes exert such an influence so long as they are going on and so long as there is a surplus of lattice energy, corresponding to a lower value of q .

Lattice distortions of other types, e.g. hereditary imperfections, will cause similar results, their special activation effect disappearing at temperatures at which the particles can attain equilibrium positions.

HEDVALL¹ carried out such experiments with Fe_2O_3 , and FRICKE² measured a surplus of lattice energy of about 5 Cal/mol. It is interesting to discuss the problem whether the change of a single crystal from one modification to another may be accompanied by a cracking process, so that smaller crystals result, and whether the new surfaces formed can facilitate the reaction.

In powder mixtures a possible desintegration of the grains has of course no such influence from a geometrical point of view because the *contact surface* does not increase if the transition process takes place during the heating of the original mixture. At most there will be a small increment to the reaction rate, which increases continually with rising temperature. This effect will evidently disappear at the recrystallization temperature of the substance in question. In systems with solids in contact with liquids or gases some addition to the reaction yield per unit seems more

¹ J. A. HEDVALL: Op. cit. pp. 82, 83, 139, 140.

² R. FRICKE and P. ACKERMANN: loc. cit.

probable, as the increased surface in such systems may also imply an increased contact surface.

In all systems, however, the most important factor influencing the reactivity of the solid is an easier transport of reactive particles from the interior of the lattice or through the reaction film; these processes regulate the reaction. This is possible only through processes facilitating the real lattice diffusion due to lower values of q .

Experiments carried out with powder mixtures or with solids together with reactive liquids or gases show, according to the experimental method used, either a discontinuous increase or a relative maximum of the yield, at or within the narrow temperature interval of transition.

The effect in question has also been established for catalytic processes and for changes of the magnetic and electric states of the lattice.¹

LINDNER has recently measured the self-diffusion in Pb-silicates and observed a considerable increase at a transition process. A similar result was obtained with Ag_2SO_4 .²

It is obvious that disintegration into smaller crystals, considered as a possible result of transition processes in crystals, cannot in principle contribute to the reactivity effect itself. But from several points of view it is interesting to investigate the conditions where such a cracking can be observed.

Evidently such an effect must to a high degree depend on the type of the substance, on the differences of the crystallographic modifications, and even on the size of the crystal.

In this paper some experiments related to the $\beta \rightleftharpoons \alpha$ transition of quartz will be described. The results are given in the following brief summary.

The material

Quartz in the form of absolutely pure rock crystal was chosen because the transition temperature (575°C for $\beta \rightleftharpoons \alpha$) is much lower than the recrystallization temperature, and because the transition process is very rapid in both directions. The quartz is also particularly interesting from various technical points of view.

Large crystals as well as ground powder (100 DIN) were used in the different experiments.

Experimental methods

The following methods were employed:

- I. Determination of the adsorption capacity (fuch sine) of quartz powder, carried out with a solution of fuch sine, compared to that of quartz powder which had undergone preliminary heating, or had been heated and cooled over the temperature range 570 – 580°C in order to induce the $\beta \rightarrow \alpha \rightarrow \beta$ transition.
- II. Microscopic and electron-microscopic investigation.
- III. Piezo-electric investigations.
- IV. Dissolving experiments.

¹ J. A. HEDVALL: Reaktionsfähigkeit fester Stoffe (Ambrosius Barth, Leipzig 1938 a. Edward Brothers, Ann Arbor 1943) pp. 127–142; 162–187; 211–215.

² R. LINDNER and G. JOHANSSON: Acta Chem. Scand. 4 (1950) p. 782; J. A. HEDVALL, R. LINDNER and N. HARTLER: *ibid.* p. 1099; R. LINDNER: *ibid.* 5 (1951), p. 735.

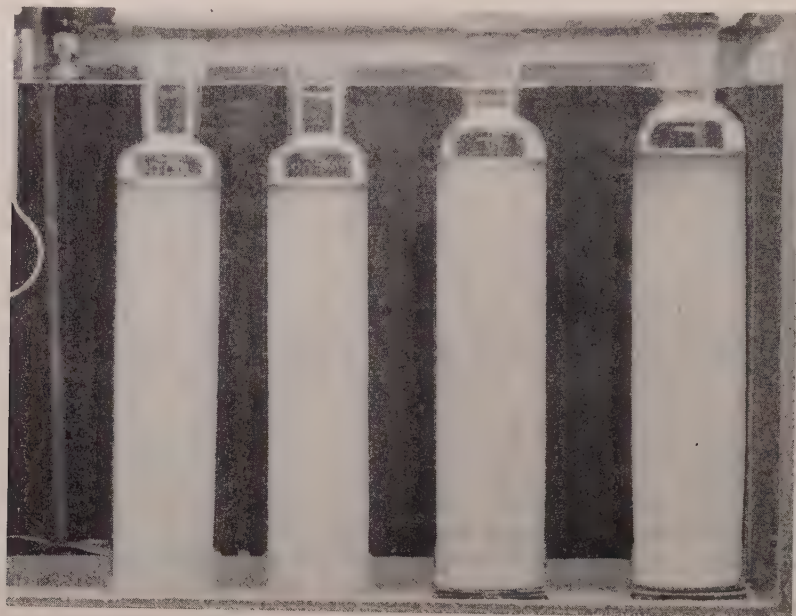


Fig. 1.

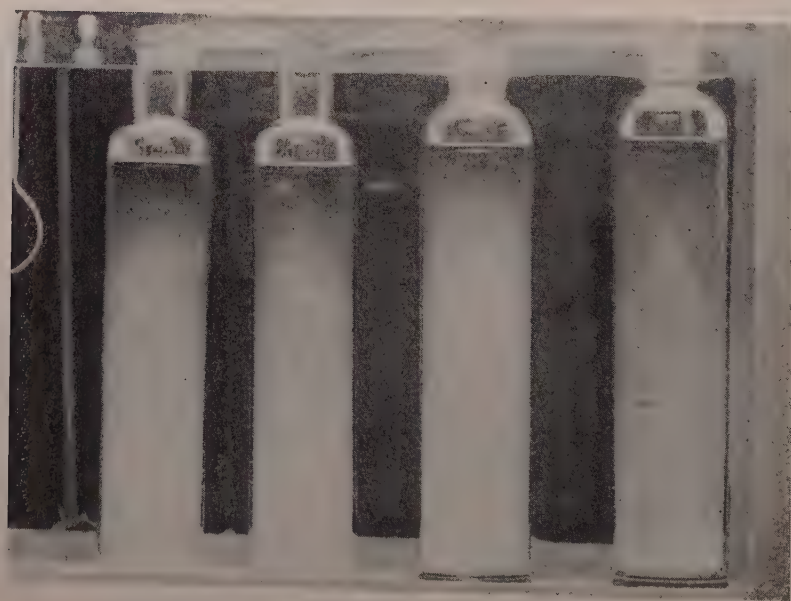


Fig. 2.



Fig. 3.

Comparison observations were made between preparations which had undergone transitions and preparations which had not.

A special furnace of supremax glass was constructed for the transition $\beta-\alpha-\beta$ at 575°C . In the heating tube, kept constant at 570°C , was placed another small furnace for the quartz preparations which allowed rapid alternate rising and falling of the temperature in the interval $570-580^{\circ}\text{C}$, by means of a special electric circuit. The temperature was measured by thermocouples the junctions of which were placed inside and outside the small transition furnace. With this apparatus it was possible to subject the quartz to a series of transitions in both directions.

Method I

Rock crystal was ground, sieved through DIN 100 mesh, and the powder rotated in order to obtain homogeneous grain size distribution.

Samples of 1,000 g were taken from this stock and placed in identical adsorption vessels with $20:00\text{ cm}^3$ of a solution of fuchsine, 0.005 g to one litre distilled water, which proved to be the most suitable concentration. The vessels were then placed in a mechanical shaker and kept there for 24 hours in darkness at room temperature. The suspensions were then centrifuged (3 500 r.p.m.). The quantity of adsorbed fuchsine was determined by a Beckmann spectro-photometer.

Though many (50) comparison experiments were carried out, no definite results were obtained. In some experiments a small increase could be observed in the adsorption capacity of those preparations which had undergone transitions, but the results could never be reproduced. After it had been carefully established that no observational errors existed, we finally found out, by means of sedimentation ana-



Fig. 4.

lysis, that the preparations compared were far from homogeneous as to grain-size distribution and crystallographic surface characteristics.

With regard to the large number (about 50) of series of experiments it is possible, however, to claim that no considerable differences in the adsorption capacity are caused by repeated β - α - β transitions of quartz.

We think that there is a certain value in establishing that such experiments with powders are not suitable for studying phenomena of this kind.

Crystallographic or geometrical differences exert, to a greater or lesser extent, an influence on the adsorption process, and in this sense it will never be possible to obtain perfectly homogeneous preparations for comparisons.

Figures 1, 2 and 3 show the highly irregular rate of sedimentation in the same experiment. The time elapsed between each exposure is 24 hours. The sedimentation was carried out at 25° C in the dark room with 1,000 g powder (DIN 100). The two vessels on the left contain the preparations which had not been subjected to transitions, the right-hand vessels preparations which had undergone transitions (4 times).

Method II

A metallurgical microscope with a magnification up to 1 800 and an electron microscope were used. In both cases large crystals, ground to different crystallographic surfaces, as well as fine powders, were studied and photographed. The optical microscope allowed observations both in transmitted and reflected light at different angles. In some experiments with the electron microscope a thin silver film was precipitated on the crystal surface in order to facilitate the observation of cracks, in which the silver was supposed to remain after mild cleaning of the surface.

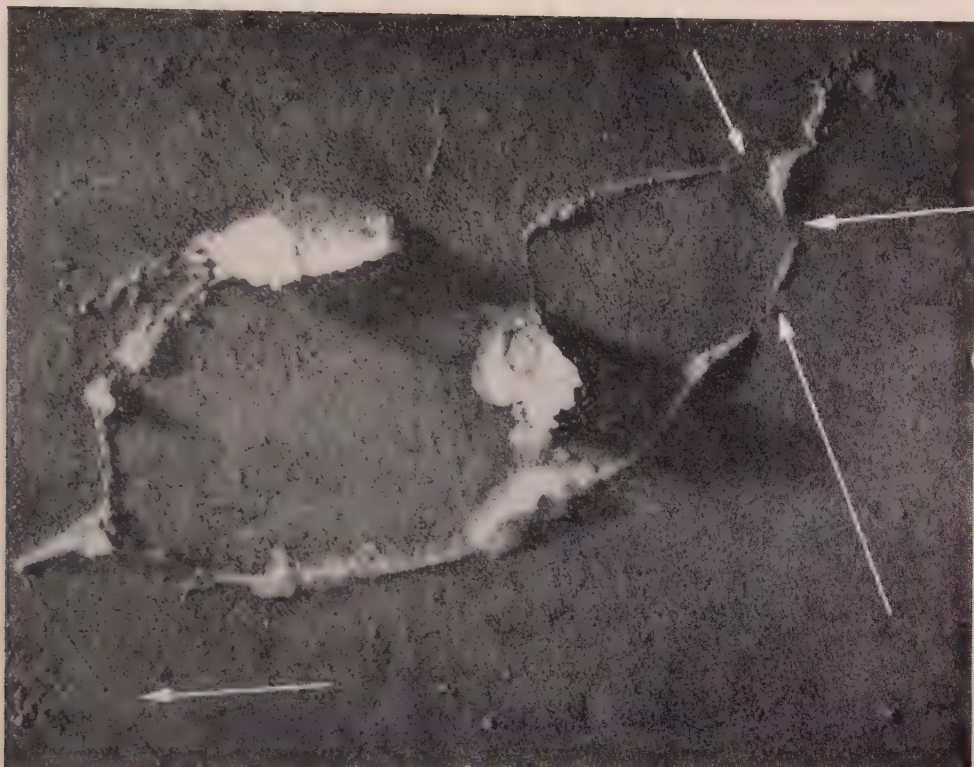


Fig. 5.

A large series of observations was made with fine powders without any sign of cracking appearing even after up to 10 transitions had been carried out as described.

The efficiency of this observation method is demonstrated by Fig. 4 (magnif. = 1000), which shows very clearly cracks produced when a *large* crystal was heated to 550° C and then rapidly cooled in a cold air current. Cracks can consequently be formed at lower temperatures than the transition temperature, at least in larger crystals.

As might be expected, experiments with differently ground crystals showed that there was a close connection between the crystallographic characteristics and the formation and direction of the cracks. The size, of course, also exerts an influence. In very small crystals the strains never seem to attain such values that the crystals fall to pieces. With the magnification employed we were never able to observe any cracks in the powder grains, which were used in all the experiments.

In order to establish whether so small cracks were produced by the $\beta - \alpha - \beta$ transition that they could not be observed by an optical microscope, observations were made by *electron microscope*. In these experiments both larger crystals and powder were used. The powder could of course be studied directly. When using specially ground and polished larger crystals it was necessary to employ the usual replication method with collodion films.

Working with large crystals only one out of many observations showed surface

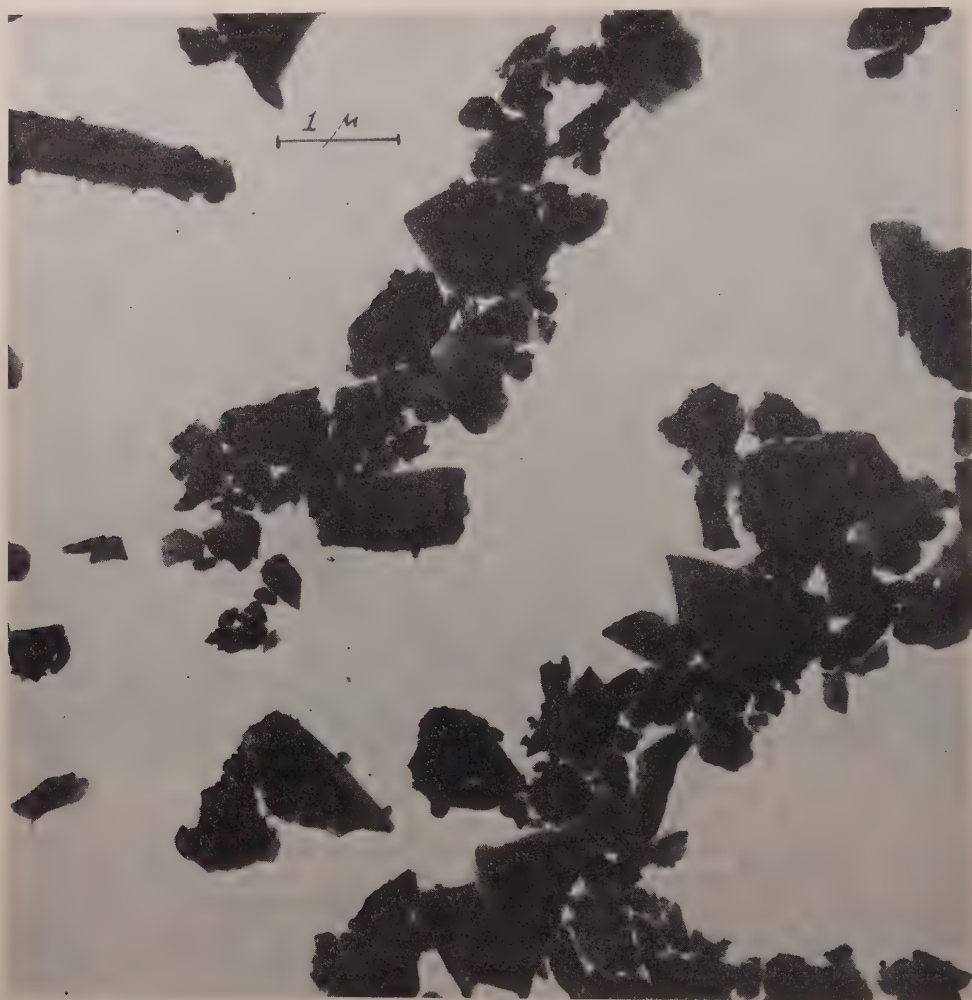


Fig. 6.

cracks. Figure 5 shows the picture of a "silver shadowed" replica of a quartz plate which was subjected to 10 transitions. Linear magnification: 17 000. The arrows indicate the places where the cracks disappear or cannot be observed. The size of the cracks at these places is about 308 Å, which corresponds to the casting limit of collodion.

It is not absolutely necessary, however, to connect the cracks with the transition process. As we have already mentioned, they may also be formed by thermal strains at lower temperatures, in the case of large crystals.

Electron-microscopical observations of powder preparations do not reveal either cracks (at least not larger than about 100 Å) or disintegration caused by the transition process. If such an influence existed, it is likely that a complete and easily observable change of the shape of the grains would occur.



Fig. 7.

The pictures 6 and 7 refer to a powder which had not undergone any transitions (Fig. 6), and to a powder which had undergone transitions in the usual manner. Linear magnification in both cases 20 000. Thus 0.1 mm on the picture corresponds to 50 Å. The human eye can distinguish a distance between two points of about 0.003 mm. If Figures 6 and 7 are compared, no indication of cracks, disintegration, or damaged edges, can be observed on Fig. 7.

No doubt such damages can be produced in different ways. We have already mentioned the cracks caused by rapidly cooling large crystals. If there is a large difference in specific volume between two modifications and especially if the transition process occurs with great rapidity, a break is to be expected, at least in the case of large crystals.

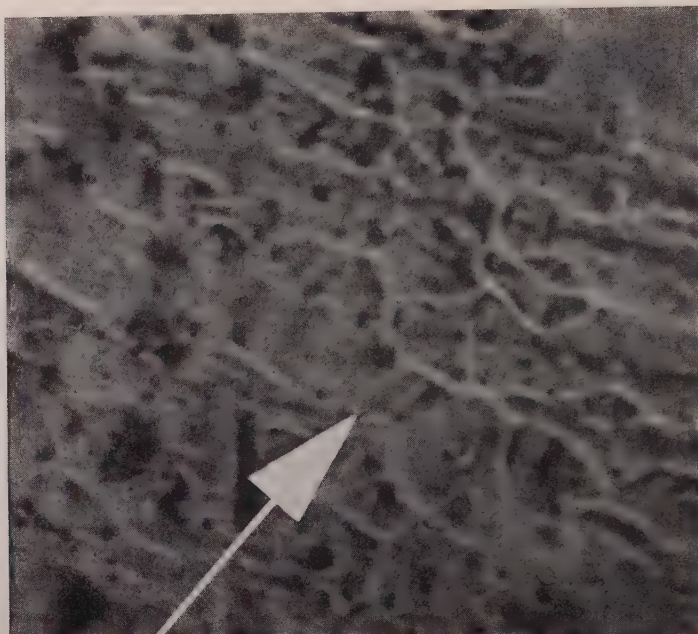


Fig. 8.

The difference in specific volume between β quartz and α cristobalite is known to be very large, but the rate of transition is slow even above 1000°C . The transition in the opposite direction occurs even more slowly.

In order to get a considerable yield of cristobalite, a large quartz crystal (as usual in such experiments about 1 cm^3) with carefully polished surfaces was heated for 80 hours at 1350°C .

Fig. 8 shows the cracks on the surface. The picture was taken with an optical microscope, magnification 400.

The formation of cristobalite started from a point (perhaps a small crack) situated just under the β -quartz surface, as can be seen in Figure 9.

At the theoretical transition temperature, about 900°C , and with rapid heating, no such effects could be observed.

The activation influence exerted by the state of instability of β -quartz above this temperature is very distinct, however, and has been demonstrated in a large number of experiments with reactive powder mixtures containing SiO_2 .¹

Method III

Only a few orientating experiments were carried out with pieces of quartz for the purposes of piezo-electric investigations. Observations were made under varying pressure and temperature conditions. It is well-known that the effect is very sensitive to thermal changes at much lower temperatures than the transition point, and lengthy hysteresis periods were noted.

¹ J. A. HEDVALL: *Op. cit.* *e.g.* pp. 132, 212.

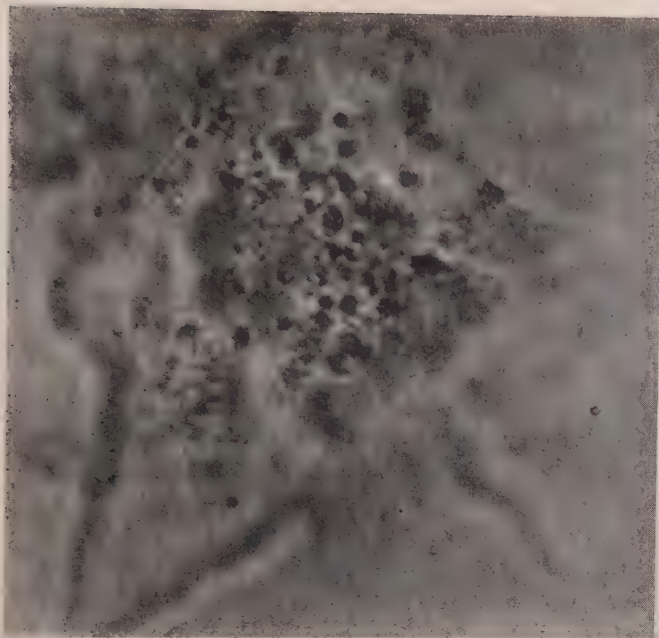


Fig. 9.

Only after 72 hours at room temperature did a plate submitted to the $\beta-\alpha-\beta$ transition produce its normal piezo-electric effect.

This method is evidently not suitable for investigations of the kind we are dealing with in this paper.

Method IV

Dissolving experiments were carried out with pieces of rock crystal ground to ideal crystal shapes. A solvent, only just strong enough to dissolve such silica preparations was wanted, because it was assumed that cracks, or other irregularities formed as a possible consequence of the transition process $\beta-\alpha-\beta$, should be attacked more easily than the original surfaces, thus discontinuously increasing the dissolved quantity. A 30 % solution of NaOH in distilled water at a temperature of 50° C fulfilled these demands.

The experiments were carried out with 12 such pieces kept for 24 hours at 50° C together with a constant quantity of the stirred solvent in sealed vessels placed in a thermostat. The procedure was as follows: weighing, dissolution, washing with alcohol, heating in the usual way at 570–580° C, weighing, dissolution, etc. The original weight of the 12 pieces was 20.8843 g. After one $\beta-\alpha-\beta$ transition and dissolution the loss by weight was 0.0001 g. Continued treatment with the NaOH solution without repeated transition did not change the weight. The total loss of weight after 15 transitions amounted to 0.0012 g.

This result agrees very well with those obtained by the other methods.

Conclusions

The increased reactivity of quartz during its $\beta-\alpha-\beta$ transition, demonstrated in a great number of investigations, is in such experiments not noticeably influenced by other factors than the state of instability during the transition and its facilitating influence on the transport of matter from the interior of the lattice.

The question whether cracks in crystals are produced by transition processes, cannot be answered in a general way. It depends on many factors: the difference in specific volume of the crystallographic modifications, the velocity of the process, the size and type of the crystal surfaces, the relation between the transition, recrystallization, and melting temperatures, and of course also on the purity of the substance. The increased surface activity and inner diffusion during transition states is a general rule. The formation of cracks varies individually. A momentarily formed crack very often is quickly "healed" because of the surface activity, so that the grain size may become larger after the transition. Powders subjected to a long series of transitions in both directions always show the relative maximum of activity during the transition.

Acknowledgements

We wish to acknowledge our indebtedness to the Mineralogy Department of the Swedish Riksmuseum, and to the Telefon AB. L. M. Eriksson, for having put quartz crystals at our disposal. To the Swedish Council of Technical Research, to the AB. Bofors Nobelkrut and to Dorch Bäcksin AB. we wish to express our gratitude for their grants which made our investigations possible.

Tryckt den 26 augusti 1952

Uppsala 1952. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

Chromatography combined with automatic recording of electrolytic conductivity, I. Description of an apparatus and applications to the analysis of amino acids and peptides

By BIRGER DRAKE

With 12 figures in the text

It has been felt that a continuous recording of conductivity¹ would be a valuable complement to other methods of measuring concentrations of amino acids and similar substances in the eluates from adsorption columns (1, 2, 3). Indeed, in certain cases this method seemed to be the only alternative to the laborious colorimetry of very long series of collected samples (4). This paper is a report on an investigation undertaken in order to develop an accurate and convenient procedure for the purpose mentioned.

When the present investigation was begun, only a manual conductivity method, applicable to the chromatography of amino acids, was described in the literature (5). While this work was in progress, a self-recording method has been described for the chromatography of penicillins (6), and the author knows of another, similar apparatus used for conductivity recordings of eluate concentrations.² Methods for automatic recording of the conductivity of flowing solutions unconnected with chromatography have also been described (7, 8).

Theoretical part

General formulas for the analysis of flowing solutions. The amount of a substance B in a flowing solution is given by the expression

$$N_B = \int_{V_1}^{V_2} c_B dV. \quad (1)$$

Here, c_B is the concentration of B, V is the volume which has passed the measuring cell (or a certain cross-section of the tube), and the subscripts 1 and 2

¹ Throughout this paper, the word "conductivity" will be used instead of the longer "electrolytic conductivity" and the word "conductivity recording" will refer to recordings either of conductance or (usually) of resistance.

² Private communication from Dr. R. R. GOODALL, Manchester, England.

indicate the limits between which the volume is measured. Usually, c_B is not measured directly, but a property p_B of the flowing solution is plotted as a function of V (in manual measurements) or of time, t , (in automatic recording). Obviously, the most favourable case is that c_B is proportional to p_B , *i.e.*, $c_B = k_B \cdot p_B$, and V to t , *i.e.*, $V = k_t \cdot t$. In such a case,

$$N_B = k_B k_t \int_{t_1}^{t_2} p_B dt. \quad (2)$$

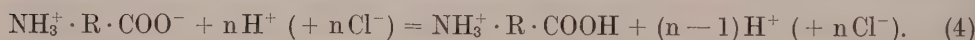
Thus, in the p_B/t graph the planimetered area $\int p_B dt$, multiplied by the two constants k_B and k_t , gives the amount of the analyzed substance. Of these two factors, k_B can be determined once and for all for each solute in each solvent, while k_t must be checked during every run.

When p_B denotes conductivity changes, the following examination of formulas for ideal cases will show the ranges within which k_B can be expected to be a constant. In the experimental part, the validity of the theoretical formulas will be proved.

Formulas for sensitivity and accuracy of conductivity recording. The basic formula for conductivity is

$$\kappa = F \cdot \sum_i c_i u_i \quad (3)$$

where κ = specific conductance ($\text{ohm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), F = one faraday (= 96494 coulombs), c = equivalent concentration (eq cm^{-3}), and u = mobility ($\text{cm}^2 \text{ volt}^{-1} \text{ sec}^{-1}$). The subscript i refers to the different ions in the solution. Because it would take us too far to discuss all the implications of this formula here, only one special case will be treated, namely, that of the dissolution of a neutral amino acid in hydrochloric acid. The formula for such a reaction, which is considered to take place without changes of volume or viscosity, can be written



During this reaction the ionic strength does not change, and the u values can be considered to be constants. Because of the fact that the carboxyl group of amino acids has a rather high dissociation constant, K_A , the law of mass action must be applied. A simple calculation gives

$$c_{A^+} = c_A \cdot \frac{1}{1 + \frac{K_A}{c_{H^+}}} \quad \text{and} \quad c_{H^+} = c_{\text{Cl}^-} - c_A \cdot \frac{1}{1 + \frac{K_A}{c_{H^+}}}. \quad (5)$$

Here, c_{A^+} is the concentration of positive amino acid ions and c_A the total concentration of amino acid. Because the Cl^- ion concentration remains constant, the conductance changes due to additions of amino acid obey the formula

$$d\kappa = F \cdot (u_{A^+} dc_{A^+} + u_{H^+} dc_{H^+}). \quad (6)$$

With dc_{A^+} and dc_{H^+} values obtained by differentiation of the formulas (5),

$$\frac{d\kappa}{dc_A} = F \cdot \frac{(u_{A^+} - u_{H^+})}{1 + \frac{K_A}{c_{H^+}}}. \quad (7)$$

For small total additions of amino acid, the concentration of H^+ ions will not change appreciably, and it is permissible to write

$$\frac{\Delta \kappa}{\Delta c_A} = F \cdot \frac{(u_A^+ - u_{H^+})}{1 + \frac{K_A}{c_{H^+}}} \quad (8)$$

This formula is important when κ is measured, but usually the resistance is measured instead of the conductance. The relation between these two quantities is

$$\kappa = \frac{K}{R} \quad (9)$$

where K = the "cell constant" (cm^{-1}) and R = resistance (ohm). The differentiation of formula (9) and the combination with formula (7) give

$$\frac{dR}{dc_A} = - \frac{K \cdot F \cdot (u_A^+ - u_{H^+})}{\kappa^2 \left(1 + \frac{K_A}{c_{H^+}} \right)} \quad (10)$$

For small changes of c_A , this formula may be written with differences instead of differentials

$$\frac{\Delta R}{\Delta c_A} = - \frac{K \cdot F \cdot (u_A^+ - u_{H^+})}{\kappa^2 \left(1 + \frac{K_A}{c_{H^+}} \right)} \quad (11)$$

Because κ^2 appears in the denominator, formula (11) is valid in a much smaller range than formula (8). A better approximation to linearity is obtained if κ is increased, *e.g.*, by increasing the HCl concentration. This lowers the sensitivity, however, and in practical cases a compromise must be found. By choosing a cell with a high K value, the sensitivity may be increased without greater deviation from linearity. This is not always possible because R also increases with K , and at high R values the unavoidable temperature fluctuations will exert a considerable effect according to the formula

$$\frac{dR}{dT} = k \cdot R = k \cdot \frac{K}{\kappa} \quad (12)$$

Here, k is a constant (for 0.1 N HCl, k is about 0.015 (9)), and T is the temperature ($^{\circ}C$). Formula (12) shows that dR/dT varies inversely with κ , while dR/dc_A varies inversely with κ^2 . This means that the first quotient will decrease more slowly than the second, when κ increases. Thus, there is a limit beyond which conductivity changes due to temperature fluctuations are too high in comparison with the changes due to variation in the concentration of the solution.

Ranges of conductivity used in practice. Fig. 1 shows the ranges of specific conductance and resistance which are commonly used in measuring and

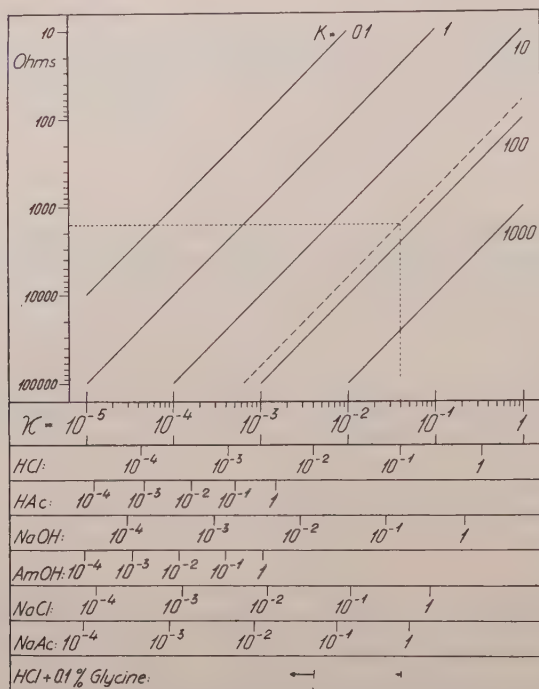


Fig. 1. Upper part: nomogram of the relation $\kappa = K/R$. Lower part: examples of specific conductances at specified molarities of some selected solutions (see the text).

recording. The upper part is a nomographic representation of the equation $\kappa = K/R$. The dotted lines give an example of the use of the nomogram, the dashed line representing a special cell used by the author. The lower part of the figure shows the specific conductance values at 25°C (9) for series of concentrations of some selected substances (Ac = acetate ion, and Am = ammonium ion). Also, in the bottom row, the arrows show the changes of specific conductance, when 0.1 % of glycine is added to two concentrations of hydrochloric acid. These changes are -43.5 % for 0.01 N HCl and -10 % for 0.1 N HCl.

Obviously, in contrast to recording a change of, *e.g.*, HCl concentrations from 0.1 N to 0.01 N or lower, the quantitative recording of the addition of some few hundredths of a percent of an amino acid requires a very high degree of accuracy.

Comparison of methods of conductivity recording.¹ The measurement of conductivity can be performed in a simple measuring circuit or in a bridge arrangement. In both cases, a direct deflection method or a compensation method may be used. A combination of these two classifications gives four different

¹ Particular consideration will be given to the recording of resistance. Only recording with A.C. is considered here, and for two methods of employing D.C. measuring the reader is referred to (11) and (12).

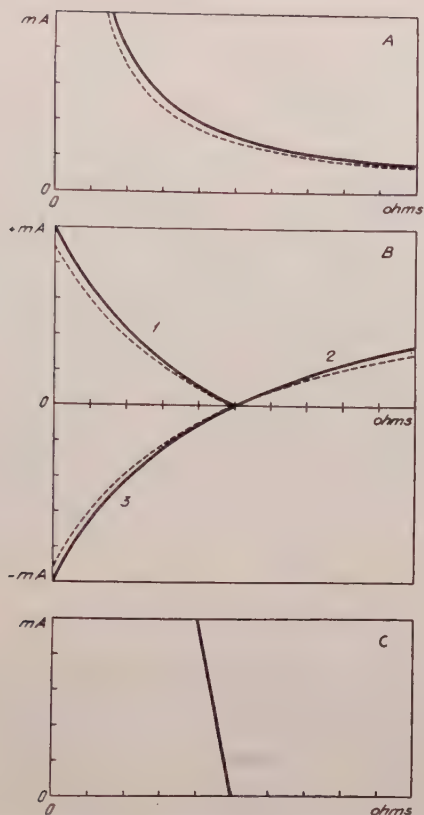


Fig. 2. Diagrams illustrating the three principles of resistance recording (see the text). Ab-scissae = resistance in ohms, and ordinates = scale divisions on the recorder, both in arbitrary units. The unbroken lines change to the dashed ones when there is a 10 % decrease of the voltage applied to the cell.

possibilities, of which the compensation in a simple measuring circuit is of no practical value for recording purposes. The remaining three possibilities will be treated below as cases 1, 2 and 3. A more complicated A.C. method which is claimed to have certain advantages has been described (13), but as the author has no experience of it, it will not be reviewed here.

In the first case, a constant A.C. voltage is applied to the cell and the current through it measured. The response is not a linear function of the resistance (Fig. 2 A), the resistance and the capacitance are measured as a single quantity, and there is no defined zero point. Thus, the method cannot be considered accurate, but it may be used to advantage in certain cases (see, *e.g.*, (10), page 454).

In the second case, a Wheatstone bridge for A.C. is used, and the "unbalance voltage" is fed, usually through an amplifier, to the recorder. As seen from Fig. 2 B, parts 1 and 2 of the curve, each reading corresponds to two different resistance values. This disadvantage, however, may be avoided by using

a phase discriminating arrangement (8) in which case the curve consists of the parts 2 and 3. In these two modifications of the same principle, the zero point is defined by the fixed ratio of two of the bridge arms and by the value of the balancing resistance. The capacitance in bridge and cell may be balanced for some specified cell resistance, and only deviations from the capacitive balance will affect the recording accuracy. This effect is usually small, but it may have a great influence in unfavourable cases, *e.g.*, when micro cells are used. In many cases this method is adequate, but it must be remembered that the response is not linear over large ranges. Also, in accurate recordings, the voltage applied to the bridge must be kept constant, and this condition may be difficult to satisfy at the frequencies which are most suitable for conductivity recordings, *i.e.*, frequencies of the order of magnitude 1000 p/s.

In the third case, which is utilized in the present work, the "unbalance voltage" from a bridge circuit is fed through an amplifier to a phase discriminating circuit, the output of which is applied to an electro-mechanical arrangement controlling one of the bridge resistances, so that balance is restored. The advantages obtained here are linear response with relatively small influence from capacitive unbalance, and independence of reasonable variations in the mains supply voltage (Fig. 2 C). Otherwise, what was claimed for the second case is also valid.

Construction of the apparatus

A conductivity recorder has been constructed which permits accurate recording, during very long periods of time, of the resistance in a small volume of a flowing solution. Below, the several parts of the apparatus will be treated separately, while the control of the function of the apparatus will be treated under the heading "Testing of the apparatus".

Adsorption columns and fraction collector. When conductivity is used for recording, some precautions are necessary which are unimportant in other forms of adsorption analysis. Of course, the effluent from the column and all conducting parts of filters, *etc.*, should not be connected to earth or any other conductor, as this might interfere with the measurements. Also, metal filters should not be used. It has even been found impossible to use filters of a special acid-resistant stainless steel (Fagersta RRNJ 44), because this introduces trouble when using 0.1 *N* hydrochloric acid as solvent. Gold-plated brass filters of the usual type (14) were not even tested, as they have been found to give off copper in acid solutions ((10) footnote, page 461).

Two alternatives were successfully tried, tapered glass tubes and screwed perspex filters. The former are easy to make, and they are very useful for elution analysis. The latter, however, should be used for frontal analysis and displacement, where coupled filters with constriction pieces between the filters (15) lead to a sharpening of the stepwise fronts. When perspex filters are used, the tapered tip of a special endpiece is connected to the conductivity cell through a polythene sleeving which is fastened by means of a short piece of a narrow rubber tube. The leads from the adsorption filter to the conductivity cell and from this to the fraction collector should be narrow (internal diameter smaller than 0.5 mm), especially as they can not always be made very short (*cf.* (10)).

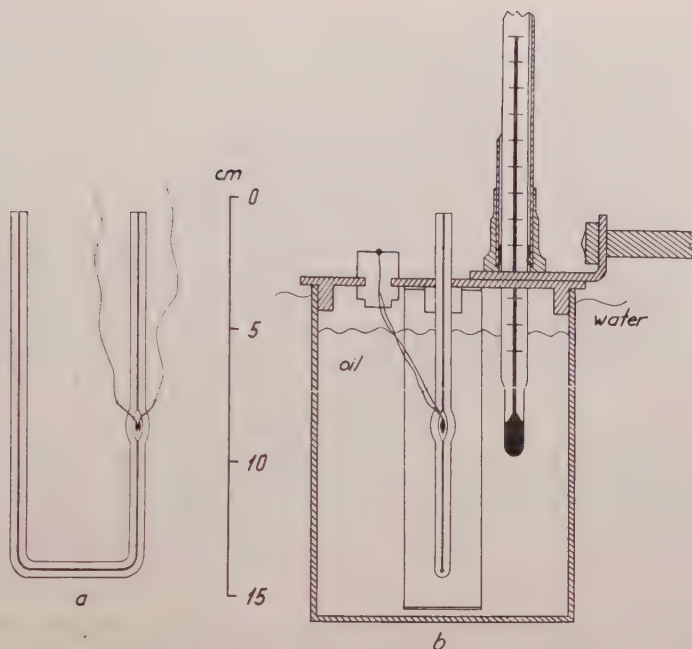


Fig. 3. Conductivity cell and oil container; *a* = a cell, *i.e.*, a capillary glass tube with two platinum electrodes in one extension, and *b* = the oil container with cell, thermometer and screened contacts (screws, *etc.*, are not shown.)

The fraction collector may be of any suitable type, but if no constant flow device is used, it is advantageous to use a fraction collector which gives the same amount in every test tube. This is, because the apparatus described here gives a record of resistance (concentration) as a function of time, so that a knowledge of flow velocity is also necessary for calculating the amounts of the substances investigated.

The recording of movements of the fraction collector will be mentioned below under the heading "Recorder".

Conductivity cell with oil container and thermostat-controlled water bath.

The element sensitive to electrolytic conductivity is a micro cell¹, consisting of a capillary U-tube having one or two small extensions, into which two platinum wires are inserted (Fig. 3 *a*). The wire parts inside the cell are flattened in order to give a larger surface area; *i.e.*, a smaller current density at the electrodes. The diameter of the capillary is 0.5 mm, and the volume of the extensions is about 0.1 ml. In this way it has been found easy to attain cell constants within the range 1 to 100 cm⁻¹ and it is possible that this range can be extended both upwards and downwards by a factor of 10.

For very small cell constants the electrodes are fixed to the glass wall at points opposite the platinum threads which lead out through the glass. This

¹ Similar micro cells have been described by STOCK (16) and SVENSSON (17).

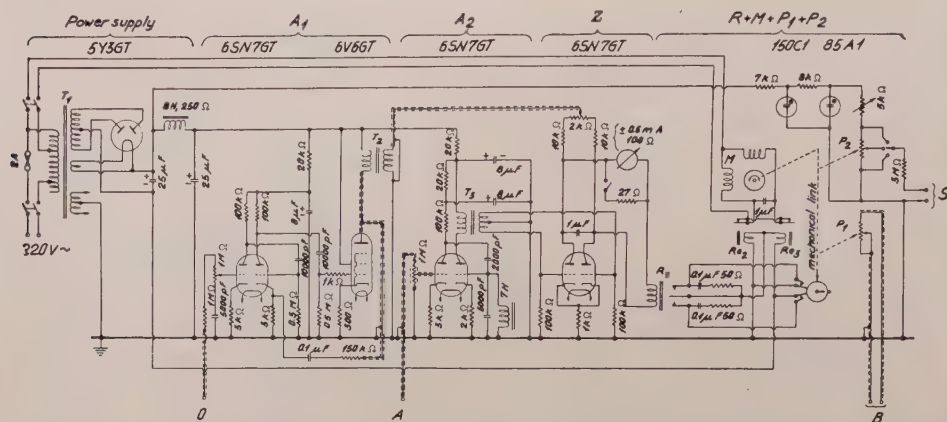


Fig. 4. Circuit diagram of the adapter. Components not specified above are: T_1 =power transformer, 2×300 V; T_2 =transformer, 1:2, 4W; T_3 =push-pull transformer, 1:1:1; R_1 =polarized relay, SIEMENS, 5000 ohms, 0.2 mA D.C.; $R_{e2}=R_{e3}$ =telegraph relays, 100 ohms, 8 V D.C.; M =BODINE synchronous motor, 1 RPM; $P_2=10\ 000$ ohms, HELIPOT. The letters $A_1, A_2, Z, R, P_1, O, A, B,$ and S are the same as in Fig. 6.

arrangement makes it possible to keep the small distance between the two electrodes more constant. Moreover, care must be taken to place the electrodes near the glass wall (if it is not unsuitable for other reasons, they can even be molded to the glass), so that the electrodes do not act as a trap for small gas bubbles which may be transported with the flowing liquid. In order to minimize polarization effects, the electrodes are platinized.

The capillary U-tube is attached to the cover of a cylindrical metal container (Fig. 3 b), which is filled with water-free oil. The cover of the container is also provided with a hole for an accurate thermometer and two screened contacts connected *via* copper threads to the short platinum threads protruding from the glass capillary. The cell is protected from damage by a thin piece of sheet metal bent around it.

The metal container is almost totally immersed in a water thermostat, kept at 25°C by means of a mercury contact thermometer. In this way the temperature of the oil is kept constant to within $\pm 0.01^\circ\text{C}$, which has been found to be a sufficient degree of accuracy for the present work. When utilizing the maximum sensitivity of the apparatus, however, a better thermostat should be used.

Electrical measuring device. Apart from the recorder, which will be treated below, the electrical part of the apparatus consists of a conventional, high quality, A.C. Wheatstone bridge¹ (amplification about 300 times; arm ratio = 1) and a special adapter. The latter makes it possible to register on a strip chart recorder the difference between the value of the cell resistance and a preset resistance value. The circuits of the adapter have been designed by Mr. F. COHN, LKB-Produkter Fabriksaktiebolag, and the adapter has been built at this In-

¹ Made by LKB-Produkter Fabriksaktiebolag, Stockholm, type 3216.

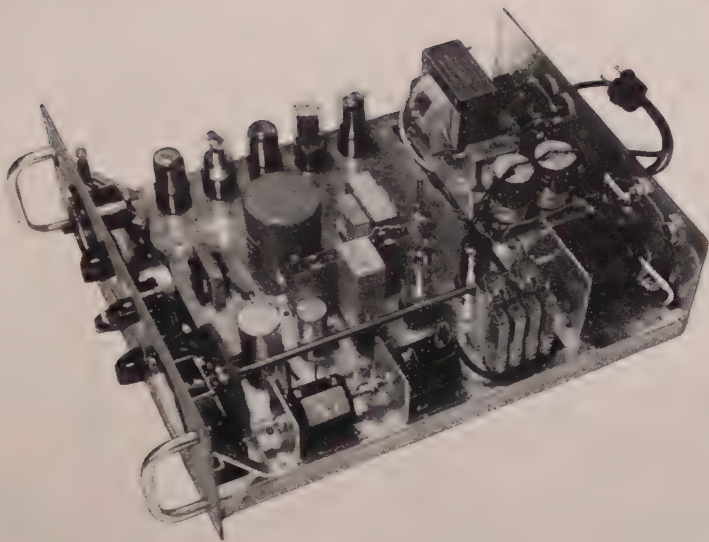


Fig. 5. Photograph of the adapter. When in use, this part is pushed into a case, which is placed under the conductivity bridge.

stitute (see Fig. 4 and Fig. 5). The principles utilized in the circuits have already been described in the telecommunication literature (*cf.*, *e.g.*, (18)).

The electrical part of the apparatus functions in the following way (see Fig. 4 and Fig. 6). The output from the oscillator O (800 p/s) is fed both *via* a "Wagner earth" circuit to the bridge B and *via* an amplifier A_1 to the anodes of a 6SN7 double triode tube in the phase-sensitive zero discriminator Z . The output from the bridge B (the "unbalance voltage") is fed *via* another amplifier $A + A_2$ to the two grids of the same 6SN7 tube. In this way an unbalance in one direction gives the first anode a higher DC potential than the other, while an unbalance in the other direction has the reverse effect. Thus, a sensitive polarized relay R_1 placed between the two anodes will close one or the other of two contacts every time the bridge comes out of balance. These contacts operate, *via* two other relays Re_2 and Re_3 , a reversible motor M , which rotates two accurate HELIPOT potentiometers. One of these which is exchangeable (the "bridge potentiometer" P_1) is incorporated into the bridge in series with the decade resistance which balances the cell resistance. Thus, the balance of the bridge is always restored whenever the cell resistance varies within the preset region. The second potentiometer, (the "output potentiometer" P_2) which is rotated exactly in step with the first, is fed with a D.C. voltage. Part of this voltage corresponding to that fraction of the first potentiometer which is added to the decade resistance, is fed to an electrical strip chart recorder S which can be of any current or voltage measuring type.

The advantages gained in this way are the following.

- 1) The bridge is always run at balance (except, of course, when the potentiometer

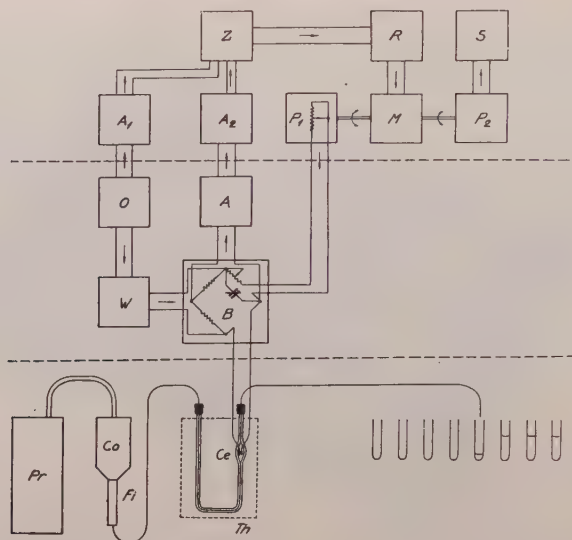


Fig. 6. Block diagram of the apparatus. Lower part: adsorption analysis set up; middle part: conductivity bridge; upper part: adapter and recorder. (Power supplies are not shown). *Pr* = (air) pressure container, if necessary; *Co* = container for the solvent; *Fi* = adsorption column (= filter); *Ce* = conductivity cell; *Th* = thermostat. The other letters are explained in the text.

meters are moving to a new value). Thus, fluctuations within reasonable limits of the mains supply voltage have no effect.

2) The frequency is high enough to avoid polarization effects, even with the small micro electrodes used here. The frequency is, however, low enough to permit easy compensation of cell capacitances and other asymmetrical capacitances.

3) The values of the bridge potentiometers are usually chosen so that they lie between 3 and 20 % of the setting of the decade resistance. Thus, the strip chart scale corresponds to a rather small part of the total resistance. Of course, this increases the sensitivity of the recording, and the paper is fully utilized.

The motor in the present model (BODINE, 1 RPM) moves the potentiometers from stop to stop (ten revolutions) in 50 seconds, which may appear to be slow. However, adsorption analyses must be run very slowly (*cf.* (10)), and the change from one concentration to another will take a much longer time than the time-lag of the electro-mechanical arrangement.

The sensitivity will depend on various factors, but the following data may be considered typical. With a cell resistance of about 1 600 ohms and a bridge potentiometer of 200 ohms, the apparatus will detect and rebalance differences of about 0.5 to 1 ohm. This means a sensitivity corresponding to about ± 0.03 – 0.06 % of the total resistance, and to about ± 0.25 – 0.5 % of the recorder range (which corresponds to the accuracy of a good potentiometer recorder). If a 50 ohm potentiometer is used, the corresponding data are about 0.2–0.5 ohms, corresponding to about 0.015–0.03 % of the total resistance, and to about 0.5–1 % of the recorder range. The data mentioned correspond to the fol-

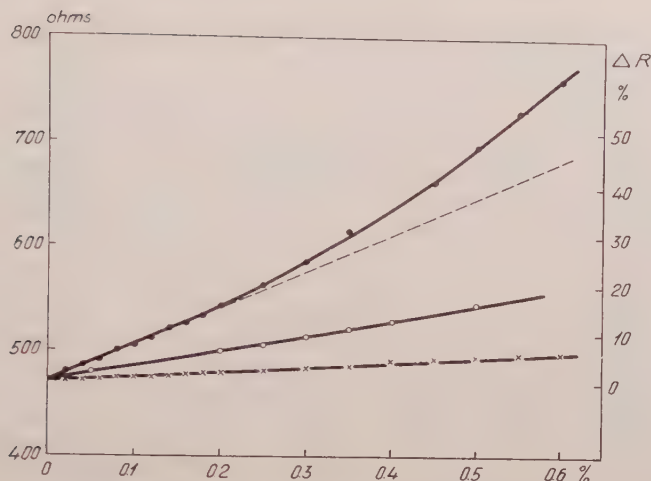


Fig. 7. Resistance values, measured at 0.5°C , for 0.1 N HCl with various additions of: 1) alanine ●, 2) a mixture of peptides (see the text) ○, and 3) casein ×. A usual type of conductivity cell was used with $K = 11.97$.

lowing conductance values. With a 200 ohm potentiometer: 625 μmhos total, 75 μmhos range and $\pm 0.2\text{--}0.4\text{ }\mu\text{mhos}$ sensitivity; with a 50 ohm potentiometer: 625 μmhos total, 19 μmhos range and $\pm 0.1\text{--}0.2\text{ }\mu\text{mhos}$ sensitivity.

Recorder. Hitherto, two types of recorders have been available, a BROWN Elektronik Potentiometer Recorder, 2.5 mV, chart width 28 cm, and an ERMI chopper bar recorder, 20 μA , 1285 ohms, chart width 12 cm. The paper speeds have usually been 5 and 3 cm per hour, *i.e.*, 120 and 72 cm per day, respectively.

When using these two recorders, the D.C. voltage to the "output potentiometer" is taken from a voltage stabilizer in the adapter. If another recorder is used, *e.g.*, a 5 mA pen recorder, it is necessary to feed another "output potentiometer" from a storage battery in order to obtain a linear response.

Two processes can be recorded simultaneously with the same apparatus (example, see Fig. 9). A camwheel driven by a synchronous motor switches over from one cell to the other at regular intervals. Each switching is accompanied by an appropriate change of a resistance in series with the cell and a change of cell capacitance compensation in order to record both curves with the same sensitivity and within the same resistance range.

When it is found desirable to record changing of tubes in a fraction collector, a microswitch is actuated each time the rack of the fraction collector moves. A second relay and a time relay then short-circuit the recorder input for some few seconds, thus giving a spike on the continuous resistance record. Fractions can afterwards be correlated to special parts of the record and taken for further analytical or preparative work. Examples of this are given in Fig. 9 and Fig. 12 where the actual arrangement was such that two marks were made for each change of tube.

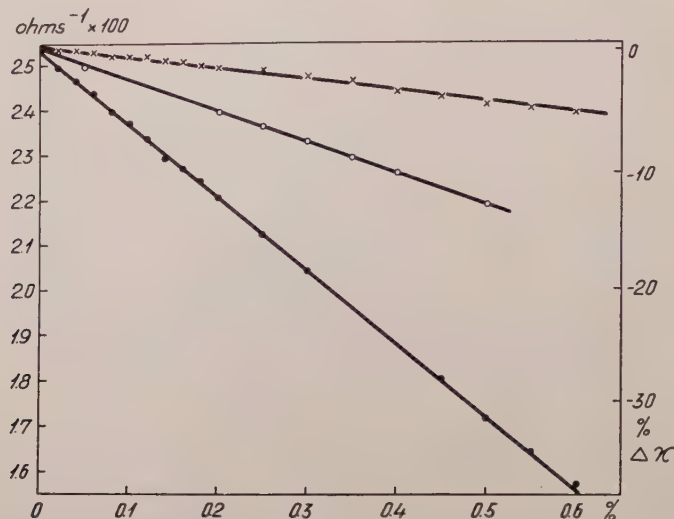


Fig. 8. Specific conductance values, calculated from corresponding data in Fig. 7, according to the formula $\kappa = 11.97/R$.

Experiments

Preliminary conductivity measurements. In order to check the linearity predicted in formulas (8) and (11) above, and in order to determine the factor for calculation of c_A from ΔR , some series of measurements were made. In three of these series the conductivity at 0.5°C was determined for $0.1\text{ }N$ hydrochloric acid with different additions of alanine, a peptide mixture¹, and casein. Fig. 7 and 8 show clearly that there is a linear relationship between conductance and concentration and, in a smaller range, between resistance and concentration. These figures also show that it might be possible to apply conductivity recording to the analysis of higher peptides. Because the equivalent weights of these substances are not all known, a comparison is more conveniently made by using percentual concentrations, here called c'_A , instead of equivalent concentrations (c_A). Thus, in $0.1\text{ }N$ HCl at 0.5°C , and with $K = 11.97$,

$$\text{for alanine:} \quad \frac{\Delta \kappa}{\Delta c'_A} = 0.0164 \quad \frac{\Delta R}{\Delta c'_A} = 350^2$$

$$\text{for the peptide mixture:} \quad \frac{\Delta \kappa}{\Delta c'_A} = 0.0068 \quad \frac{\Delta R}{\Delta c'_A} = 150$$

$$\text{and for casein:} \quad \frac{\Delta \kappa}{\Delta c'_A} = 0.0024 \quad \frac{\Delta R}{\Delta c'_A} = 50$$

¹ The mixture had been prepared (HAGDAHL, private communication) from casein by partial hydrolysis and a special chromatographic procedure, using displacement on charcoal. The average content of amino acid residues was 5–6.

² According to the dashed line in Fig. 7.

Testing of the apparatus. In order to check the general performance of the apparatus, some simple tests were made, and these included the following. The mains voltage was varied between 190 and 250 volts, a solution of 0.1 *N* HCl was left in the micro cuvette for some hours while a recording was taken, and base lines were recorded for several days and nights. In this way it was shown that mains voltage fluctuations of more than 10% had no influence on the performance, and that polarization effects were too small to be detected. The base lines obtained showed the small unsystematic variation which could be expected from consideration of temperature fluctuations in the thermostat, sensitivity of the measuring device, *etc.*

In order to test the linearity of response of the electrical parts, the decade resistance was altered in equal steps, and each time the balance was subsequently restored, the position of the pen on the strip chart was observed. The result of such a test is given in Table I. Similar series of measurements, in which the "unknown" resistance was a decade resistance which was altered, have given analogous results.

Table 1

Test of linearity of response of the electrical parts of the apparatus. "Unknown" resistance, $R_u = 1616.3$ ohms. 200 scale divisions on the strip chart correspond to 197.7 ohms on the bridge potentiometer.

Decade resistance D	Pen position on strip chart P	Pen position, corrected $P_c = P \cdot \frac{197.7}{200}$	Experimental value of unknown resistance $R_e = D + P_c$	Difference $R_e - R_u$
(1 616.3)	0			
1 600	16.6	16.4	1 616.4	0.1
1 580	36.9	36.5	1 616.5	0.2
1 560	56.9	56.3	1 616.3	0.0
1 540	77.4	76.5	1 616.5	0.2
1 520	97.9	96.8	1 616.8	0.5
1 500	118.9	117.2	1 617.2	0.9
1 480	138.9	137.3	1 617.3	1.0
1 460	159.2	157.4	1 617.4	1.1
1 440	179.2	177.1	1 617.1	0.8
1 420	199.3	197.0	1 617.0	0.7
(1 418.6)	200			

Table 2

Determination of overall accuracy by comparing recorded values (ΔR_r) with values obtained by manual operation ($R_m = R_0 + \Delta R_m$). Preset value of the decade resistance $R_0 = 1600$ ohms; and bridge potentiometer = 200 ohms.

Solution	ΔR_r ohms	ΔR_m ohms	Difference ohms
0.1 <i>N</i> HCl	41	42.0	-1.0
0.1 <i>N</i> HCl + 0.134% aspartic acid	172	173.0	-1.0
0.1 <i>N</i> HCl + 0.134% glutamic acid	166	165.7	+0.3

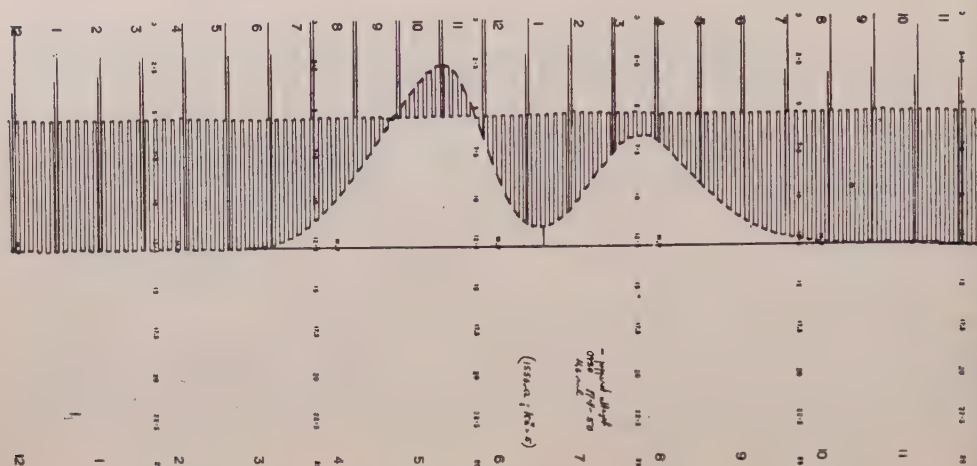


Fig. 9. Simultaneous recording during 6 hours of two runs, one of which shows two peaks corresponding to zones of aspartic and glutamic acid. The double spikes indicate movements of a fraction collector with one row of test tubes for each run.

The overall accuracy of the apparatus as regards the determination of ΔR values was estimated in the following way. The strip chart values for some different solutions were compared with the corresponding values obtained with the same cell and the same bridge (which are considered to be of high quality) but with the use of earphones for the detection of the balance point. The result of such a comparison is shown in Table 2.

Fig. 9 shows a part of a test run with two simultaneous records, the changing of tubes in the fraction collector being marked as well.

Elution analysis. The most promising of the adsorption systems tried hitherto is the separation of aspartic acid and glutamic acid on Dowex 50 (250–500 mesh) in 0.1 *N* HCl. Higher concentrations of HCl would give a better separation (4), but recording at concentrations of the order of 1 to 4 *N* is very difficult (*cf.* the formulas in the theoretical part), and as no suitable cells were available, this lower concentration was tried.

A column in a tapered glass tube with 2 mm inner diameter, filled to 240 mm length, was found suitable for the separation of mixtures of about 0.5–1 mg of aspartic acid plus glutamic acid. Three representative curves, obtained with the BROWN recorder, are shown in Fig. 10 where the upper record shows an analysis of a known mixture and the other two analyses of the anodic fractions from electrodialyses of total hydrolysates of proteins prepared by Dr. C. WEIBULL (19), and Dr. C. E. DANIELSSON (20), respectively. The evaluations of these and other curves have been done by application of formulas (2) and (11) above. The data have been collected in Table 3, where they are expressed as % aspartic acid of the total aspartic plus glutamic acid and as mole fraction.

According to a determination by the ninhydrin method (21), 95% of the aspartic acid introduced to the column was recovered in the eluate, while the planimetry of conductivity records has always given recoveries of the order of

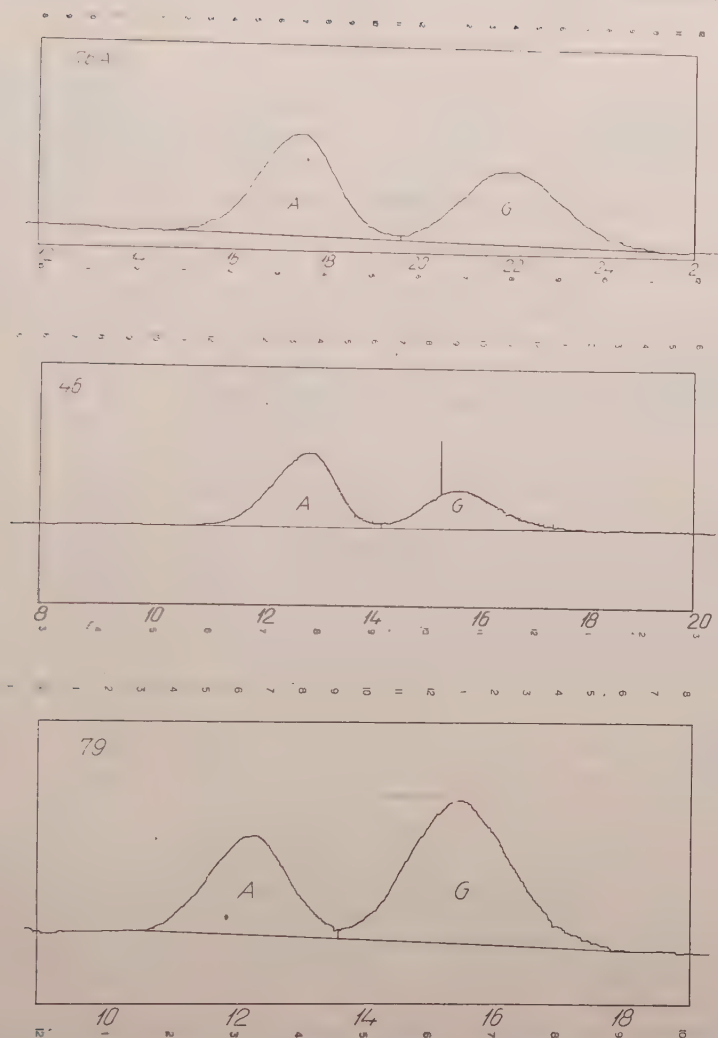


Fig. 10. Elution analyses of mixtures of aspartic acid (A) and glutamic acid (G). Resistance ranges: a) and c) 50 ohms; b) 200 ohms. The numbers of the runs are the same as those in Table 1, column 1. Numbers along the horizontal axes indicate hours. The first part of each curve (10–15 hours) is not shown.

85%. The reason for this discrepancy may be that the partition of hydrochloric acid between the resin and the solvent is slightly altered when the amino acids are retained by the ion exchanger. Irrespective of this fact, however, the quotient aspartic acid/glutamic acid is obtained with a fair degree of accuracy.

For these runs, the value of k_t (cf. formula (2) above) was found to be constant during each separate run. The preparations used as test substances were analytically pure and were both dried at 100°C *in vacuo* over silica gel. When chromatographed on paper, the aspartic acid was found to be pure, while the glutamic acid was found to contain traces of other ninhydrin-positive substances. The calibration data used are found in the R_m column of Table 2.

Table 3

Data from some elution analyses of mixtures of aspartic acid (A) and glutamic acid (G). Chromatographic column: 2×240 mm of Dowex 50; solvent: 0.1 *N* HCl. In column 2, K = known mixture; B = mixture from bacterial flagella (19); V = mixture from vicilin and L = from legumin (20).

Run nr	Sample	Total amount mg	Flow rate ml/hour	A area cm ²	G area cm ²	% A found = $\frac{100 \times \text{mg A}}{\text{mg A} + \text{mg G}}$	Mole fraction of A found = eq. A / (eq. A + eq. G)
50	K: 50.0 % A	1.2	—	38.1	35.5	50.4	0.528
51	K: 50.0 % A	1.0	0.92	30.6	29.5	49.5	0.519
76A	K: 49.9 % A	—	—	106.3	104.1	49.1	0.516
85	K: 39.9 % A	0.5	—	71.4	101.0	40.0	0.425
46	B	1.2	0.78	49.3	30.2	60.6	0.630
54	B	1.2	0.68	58.6	37.8	59.4	0.617
55	B	1.2	0.64	60.6	39.6	59.1	0.615
78	V, prep. 8	—	0.78	72.6	96.4	41.6	0.440
80	V, prep. 9	—	—	58.2	84.4	39.5	0.419
87	V, prep. 9	—	0.73	104.2	148.2	39.9	0.423
84	V, prep. 10	0.5	—	100.0	133.7	41.4	0.439
89	V, prep. 10	0.5	—	74.5	93.7	42.9	0.453
77	L, prep. 4	—	0.58	99.5	159.8	37.0	0.394
79	L, prep. 6	—	—	60.7	110.9	34.1	0.363
86	L, prep. 6	—	0.75	82.9	148.9	34.4	0.367
81	L, prep. 7	—	—	59.3	95.3	37.0	0.394

In other runs on Dowex 50 in 0.1 *N* HCl, it has been found that glycine and alanine give one high, composite peak, whereas valine gives a separate, lower and broader peak. Serine and threonine come out together with glutamic acid. Some few test runs indicate that the same adsorption system may also be used for conductivity recording of the separation of salts of sodium, potassium and ammonium.¹

For amino acids as well as for alkali metals, the negative ions in the sample do not influence the recording of elution zones. It is even possible to have the amino acid sample dissolved in a rather concentrated solution of a strong acid, because the latter passes straight through the column, and the ion exchange of the amino acids takes place in the eluting solution only.

Frontal analysis. Fig. 11 gives an example of a frontal analysis, recorded on the ERMI recorder. Other runs with other amino acids or small peptides have given similar results.

Displacement analysis. A "carrier displacement" analysis of a mixture of 0.2 mg each of methionine, leucylglycylglycine and phenylalanine was performed, closely following the directions given by TISELIUS and HAGDAHL (22). As will be seen from Fig. 12, the fronts of the carriers *n*-butanol (1) and *iso*-pentanol

¹ Cf. WICKBOLD (private communication from Professor O. SAMUELSSON, Gothenburg).

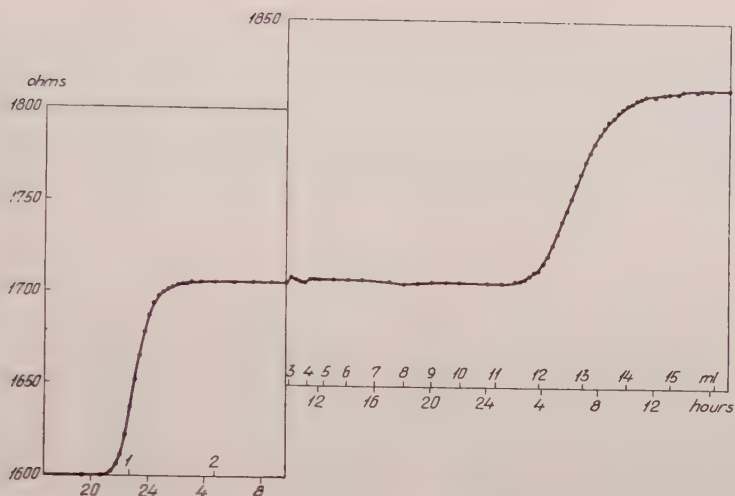


Fig. 11. Frontal analysis of 0.05% glycine and 0.05% arginine in 0.1 *N* hydrochloric acid, recorded on the ERMI recorder. Column: $250 + 100 + 50 \pi \text{ mm}^3$ ($= 1.25 \text{ ml.}$) of Amberlite IR 100. Because of the large change in the cell resistance, the setting of the decade resistance was altered once during the run. The length of the actual graph was 150 cm, and it was redrawn with another proportion between length and height instead of being photographed. The eluate volume, calculated from several measurements, has been plotted together with the time on the horizontal scale.

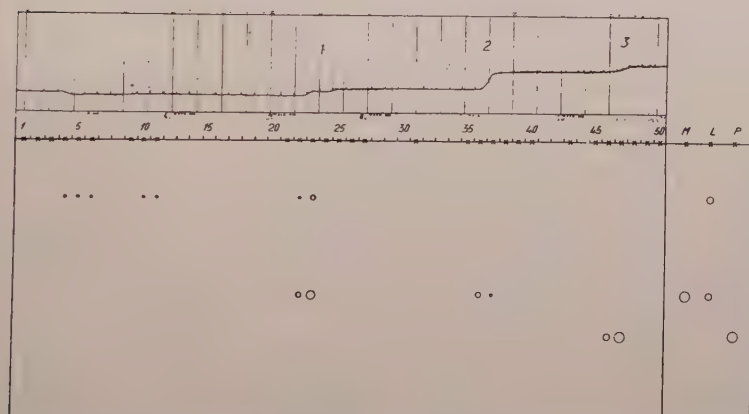


Fig. 12. Upper part: conductivity changes during carrier displacement of methionine (M), leucylglycylglycine (L), and phenylalanine (P). Resistance range: 1600–1800 ohms. 50 fractions, each containing about 1.5 ml, were collected during 24 hours. Because of the faintness of the curve, this has been inked before photographing. Lower part: paper chromatograms of the relevant fractions and of the three test substances (starting points marked with crosses). The sizes of the circles give a subjective estimation of the amounts in the spots.

(2), and of the displacer *n*-pentanol (3), are readily recorded, in spite of the facts that the smaller ERMI recorder was used and that maximum sensitivity was not utilized. In this case, the amino acids do not seem to give any response, and the record is based only on the fact that alcohols decrease the conductivity of HCl. The lower part of Fig. 12 shows the result of a series of paper chromatograms in 40 % *n*-butanol/10 % acetic acid, performed on the relevant eluates and on the test substances.

Discussion

The results given above show that conductivity recording can be used to advantage in certain cases. However, a discussion of its applicability is desirable. The points to be discussed are sensitivity, accuracy and stability.

In rather dilute solutions of strong acids, the addition of another dissociable substance will produce a relatively large change in the conductivity. However, in buffer solutions or in concentrated solutions of strong acids the changes due to the addition of other substances are small, and recording becomes a difficult task. Conductivity recording is therefore not a method which can be generally applied, but there are several cases of adsorption analysis which can be followed by this method.

As to the different types of adsorption, it can be said that conductivity recording is especially applicable to ion exchange reactions where the exchanged ions have different mobilities. The most suitable case is the exchange of an H^+ ion for a large positive ion. However, it may happen that the change in conductivity afforded by an ion exchange reaction is smaller than expected because of the fact that the composition of the solvent also changes. The same phenomenon is met with in the adsorption on, *e.g.*, active carbon, but it is here much more pronounced. Thus, it may even happen that the two effects of solute adsorption and solvent change nearly cancel. This was found to be the case, *e.g.*, when tryptophane was absorbed on charcoal. Of course, such a cancellation leads to a very low sensitivity. Some common cases of partition chromatography which were investigated showed a behaviour similar to that of the classical adsorption. In such cases the changes of conductivity in the eluates were actually too small to be detected. However, this difficulty may be overcome by measuring instead the conductivity of the aqueous phase in the bottom part of the column (6). Hitherto, this method has not been used by the author, because it is thought, *a priori*, that changes in the packing during long runs, *etc.*, will lead to difficulties in quantitative analysis.

In cases where the conductivity variations in the eluate or in the column are inconveniently small, it may be possible to alter the adsorption system so that these variations increase without decreasing the separation efficiency. The author is going to try to extend the applicability of conductivity recording by this and other means in order to get better methods for the analysis of amino acids, peptides and other biochemical substances.

The magnitude corresponding to concentration of a certain solute is the change in conductivity and not the conductivity itself. Thus, there is usually no need for an absolute measurement of conductance (or resistance). If the bridge used for recording is also used for the preliminary calibrations with known solutions,

possible errors in the arm ratio, *etc.*, will exert no influence. However, an error may be introduced by the change in the composition of the solvent which may accompany the adsorption of solutes. This drawback is serious for absolute measurements of amounts of solutes, but it is always possible to determine a correction factor for each solute in the actual adsorption system. For aspartic acid and glutamic acid, these factors seem to be very similar, but in other cases they may differ appreciably. For similar substances, however, they ought to be nearly alike.

An estimation of relative concentrations is easily performed, when the correction factors are identical or nearly identical. The separation of aspartic acid and glutamic acid which was described above belongs to this category. In the cases where only relative concentrations are estimated and where the amounts of the substances are of the same magnitude, it may be possible to obtain fairly accurate results even with curved calibration lines.

Because of the fact that only *changes* of conductivity are important, it does not matter very much if the base line drifts slowly. However, for some purposes it may be important to have absolutely straight and horizontal base lines. The apparatus used in this work, *i.e.*, a self-balancing bridge which is insensitive to mains voltage fluctuations, *etc.*, seems to give the best conditions for fulfillment of this requirement.

SUMMARY

A method is described for the automatic, continuous recording of resistance in a small conductivity cell in order to follow concentration changes in eluates from adsorption columns.

The apparatus described can be connected to any type of mA- or mV-sensitive strip chart recorder, and high sensitivity together with good accuracy are obtained. The apparatus can be run during long periods of time without drifting.

An accurate determination of the proportions of aspartic acid and glutamic acid in mixtures is described, and other examples of the recording of adsorption analyses of amino acids and peptides are given.

The author wishes to express his gratitude to Professor ARNE TISELIUS for helpful criticism and for facilities put at his disposal. The author also wishes to thank the members of the staff of the Institute of Biochemistry including the workshop staff (head: Mr. I. ERIKSSON) for valuable discussions. The design of the electrical circuits is due to Mr. F. COHN, Stockholm; Mr. G. LUNDHOLM has assisted with the construction of the electrical assembly; and Mrs. KARIN ARVEDSON and Mr. S. JERSTEDT have given helpful technical assistance, which is all gratefully acknowledged.

This work is part of a research programme on adsorption analysis which is financially supported by a grant to the Institute of Biochemistry from *The Swedish Natural Science Research Council*.

Institute of Biochemistry, University of Uppsala, Uppsala, Sweden.

REFERENCES: 1. Tiselius, A. and Claesson, S. *Arkiv Kemi Mineral. Geol. B* 15 (1942) no. 18. — 2. Claesson, S. *The Svedberg, 1884-1944*, Uppsala, p. 82. — 3. Zaukelies, D. and Frost, A. A. *Anal. Chem.* 21 (1949) 743. — 4. Stein, W. H. and Moore, S. *J. Biol. Chem.* 176 (1948) 337. — 5. Partridge, S. N. and Westall, R. G. *Biochem. J.* 44 (1949) 418. —

6. James, A. T., Martin, A. J. P. and Randall, S. S. *Biochem. J.* 49 (1951) 293. — 7. Blake, G. G. *J. Sci. Instr.* 22 (1945) 174. — 8. Bijker, J. *Anal. Chim. Acta* 2 (1948) 628. — 9. Roth, W. A. and Scheel, K. *Landolt-Börnstein, Physikalisch-chemische Tabellen: 1923-1936*. — 10. Drake, B. *Anal. Chim. Acta* 3 (1949) 452. — 11. Lundegårdh, H. *Physiologia Plantarum* 2 (1949) 388. — 12. Palmer, R. F. and Scott, A. B. *J. Am. Chem. Soc.* 72 (1950) 4821. — 13. Moneypenny, H. K. *J. Sci. Instr.* 26 (1949) 120. — 14. Claesson, S. *Arkiv Kemi, Mineral. Geol. A* 23 (1946) no. 1. — 15. Hagdahl, L. *Acta Chem. Scand.* 2 (1948) 574. — 16. Stock, J. T. *Analyst* 73 (1948) 600. — 17. Svensson, H. *J. Am. Chem. Soc.* 72 (1950) 1974. — 18. Batcher, R. R. and Moulic, W. *The Electronic Control Handbook*, 1946. — 19. Weibull, C. *Acta Chem. Scand.* 5 (1951) 529. — 20. Danielsson, C. E. *Acta Chem. Scand.* (to be published). — 21. Moore, S. and W. H. Stein, *J. Biol. Chem.* 176 (1948) 367. — 22. Tiselius, A. and Hagdahl, L. *Acta Chem. Scand.* 4 (1950) 394.

Tryckt den 5 september 1952

Uppsala 1952. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

The crystal structure of $\text{U}(\text{OH})_2\text{SO}_4$

By GEORG LUNDGREN

With 1 figure in the text

The crystal structure of $\text{Th}(\text{OH})_2\text{SO}_4$ was determined recently (LUNDGREN 1950). Now, the close resemblance between Th^{IV} and U^{IV} suggests that there should exist a compound $\text{U}(\text{OH})_2\text{SO}_4$, isomorphous with the corresponding thorium salt. However, in GMELIN's Handbuch (1936) only $\text{UOSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and $3\text{UOSO}_4 \cdot \text{U}(\text{SO}_4)_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ are described, and no more oxy-sulphates of tetravalent uranium seem to have been reported since 1936. Attempts were made to prepare these compounds according to the methods of preparation quoted in GMELIN, but only products amorphous to X-rays were obtained. It seemed, then, desirable to investigate the system $\text{UO}_2\text{--SO}_3\text{--H}_2\text{O}$ more carefully to see if any more uranium oxy-sulphates do indeed exist. For this purpose experiments on the hydrothermal hydrolysis of uranium(IV) sulphate solutions at temperatures between 100°C and 250°C were undertaken, and it was found possible to prepare two basic uranium(IV) sulphates not previously described, namely $\text{U}(\text{OH})_2\text{SO}_4$ and a compound with the empirical composition $\text{UOSO}_4 \cdot \frac{1}{3}\text{H}_2\text{O}$. Only the first compound will be dealt with here; a description of the preparation and the structure of the latter compound will be published subsequently.

Preparation of $\text{U}(\text{OH})_2\text{SO}_4$

Uranium(IV) sulphate solutions in 10 ml portions were sealed in thick-walled glass tubes (Pyrex) and heated in an oven for about a week, during which time $\text{U}(\text{OH})_2\text{SO}_4$ formed as a crystalline precipitate, if the temperature was kept between 100°C and 150°C , and if the solution was 0.1–0.5 *M* in sulphuric acid. Good crystals for X-ray work were obtained at 125°C using a solution prepared by diluting 0.5 *M* sulphuric acid saturated with uranium(IV) sulphate with an equal amount of water. After heating the solution was cooled and the crystals filtered off, washed with water, and dried in air. They form dark green, almost black rods, often in clusters, but if they are ground, a greyish powder is obtained.

$\text{U}(\text{OH})_2\text{SO}_4$ is only slowly attacked by sulphuric acid (1 : 1), but warm nitric acid (1 : 1) dissolves it rapidly, oxidizing the tetravalent uranium to the hexavalent state.

Analysis

A sample was dissolved in warm nitric acid (1 : 1), and the *uranium* was precipitated with 8-hydroxyquinoline according to HECHT and DONAU (1940). The precipitate was filtered off, washed with water, ignited, and weighed as U_3O_8 . The amount of *sulphate* in the filtrate was determined gravimetrically by precipitation as BaSO_4 .

The *water* was determined by HARTWIG-BENDIG's (1941) modification of BRUSH (1868) and PENFIELD's (1894) method as described by KOLTHOFF and SANDELL (1943).

The density of the crystals was determined from the loss of weight in benzene.

	Found	Calculated for $U(OH)_2SO_4$	
% UO_2	73.3	73.5	73.36
% SO_3	21.4	22.6	21.75
% H_2O	4.9	4.8	4.89
Density	5.0 ₆	5.0 ₅	5.12

Unit cell and space group

A crystal was set with (010), the axis of the rod, as rotation axis, and rotation and WEISSENBERG photographs ($h\ 0\ l$, $h\ 1\ l$, $h\ 2\ l$) were taken using CuK radiation. As was expected the crystal proved to be isomorphous with the crystals of $Th(OH)_2SO_4$ (LUNDGREN 1950). Thus it is orthorhombic, and the only reflections systematically absent are $h\ k\ 0$ when h is odd and $0\ k\ l$ when $k+l$ is odd, indicating that its space group is D_{2h}^{16} or C_{2v}^2 . The unit cell dimensions of the uranium salt, however, are slightly smaller than those of the thorium salt due to the normal decrease in ionic radius with increasing atomic number for the 5 *f* elements (ZACHARIASEN 1948). As calculated from powder photographs in focusing cameras with $Cr\ K$ radiation ($\lambda_{CrK\alpha_1} = 2.28962\ \text{\AA}$) the unit cell dimensions of $U(OH)_2SO_4$ and $Th(OH)_2SO_4$ are (cf. Table 1):

$U(OH)_2SO_4$	$Th(OH)_2SO_4$
$a = 11.572 \pm 0.005\ \text{\AA}$	$11.733 \pm 0.005\ \text{\AA}$
$b = 5.926 \pm 0.005\ \text{\AA}$	$6.040 \pm 0.005\ \text{\AA}$
$c = 6.969 \pm 0.005\ \text{\AA}$	$7.059 \pm 0.005\ \text{\AA}$
$V = 477.9_0\ \text{\AA}^3$	$500.2_7\ \text{\AA}^3$

Number of formula units in the unit cell = $3.95 \approx 4$.

Determination of the structure

The observed intensities of corresponding reflections for $U(OH)_2SO_4$ and $Th(OH)_2SO_4$ (LUNDGREN 1950) are very nearly the same, the only difference being a small absorption effect depending on the shape of the crystals, which occurs in the WEISSENBERG photographs of $Th(OH)_2SO_4$, and which is not found in the case of $U(OH)_2SO_4$. Because of the dominating contribution to the intensities given by the metal ions these should then be situated in the same way and have the same atomic coordinates in the two crystals. Thus for the four uranium atoms in the unit cell of $U(OH)_2SO_4$ we have:

4 U in D_{2h}^{16} 4 (c): $\pm (x, \frac{1}{4}, z)$; $\pm (\frac{1}{2} + x, \frac{1}{4}, \frac{1}{2} - z)$ with $x \approx 0.064$ and $z \approx 0.148$.

The light oxygen and sulphur atoms make only small contributions to the intensities compared to the thorium or uranium atoms, and in $Th(OH)_2SO_4$ their positions

Table 1

 Powder photographs of $\text{U}(\text{OH})_2\text{SO}_4$. CrK radiation. $\lambda_{\text{CrK}\alpha_1} = 2.28962 \text{ \AA}$.

hkl	$10^4 \sin^2 \theta$ calc	$10^4 \sin^2 \theta$ obs	I calc	I obs	hkl	$10^4 \sin^2 \theta$ calc	$10^4 \sin^2 \theta$ obs	I calc	I obs
111	741	742	19	vw	611	4166	4162	44	m
210	765	765	11	vw	521	4210	(4205)	4	(vww)
211	1035	1033	30	w+	223	4313	(4309)	17	(w)
002	1079	—	1	—	004	4317	—	25	—
301	1151	1148	7	vw	413	4368	—	3	—
102	1177	1179	2	vww	104	4415	—	2	—
202	1471	—	1	—	331	4510	4502	35	w
020	1493	1490	26	w	132	4536	4527	71	m
311	1524	(1520)	38	(w+)	602	4603	4612	3	vww
112	1550	1548	81	m	204	4709	4710	16	vw
400	1566	—	2	—	114	4789	4789	25	vw
401	1836	—	21	—	323	4802	—	5	—
212	1844	1838	10	w	232	4830	4814	15	vw
121	1861	—	10	—	503	4875	4875	11	vww
220	1884	1882	20	vw	430	4925	4923	49	w
410	1939	1939	56	m	612	4976	—	3	—
302	1960	1963	20	vw	620	5016	5024	22	m
221	2154	2151	35	w	522	5019	—	79	—
411	2209	(2206)	1	(vww)	701	5065	—	31	—
312	2333	(2332)	6	(vw)	214	5082	5073	38	w+
103	2526	2530	43	m	431	5195	(5193)	0	(w)
022	2572	(2563)	0	(vww)	304	5198	—	17	—
321	2644	—	7	—	513	5249	5253	76	m-
402	2645	—	0	—	621	5286	—	25	—
122	2670	2665	28	w	332	5319	5322	12	vww
501	2717	2714	8	vw	711	5439	5436	4	vww
013	2802	2807	6	vw	423	5487	5493	13	vww
203	2820	—	2	—	314	5572	5581	10	vww
113	2900	2902	13	vw	033	5788	—	5	—
222	2964	2965	5	vww	024	5810	5820	24	vww
412	3019	(3005)	8	(vw)	702	5875	—	7	—
420	3059	(3051)	1	(vww)	404	5883	5892	0	vww
511	3090	3093	24	w	133	5886	—	6	—
213	3193	3185	10	vw	124	5908	—	10	—
303	3309	—	9	—	603	5952	—	1	—
421	3329	3325	83	st	040	5972	5978	46	vww
322	3453	3452	92	m+	432	6004	(6002)	4	(vww)
600	3523	—	13	—	531	6076	—	28	—
502	3526	3529	55	m+	622	6096	6089	12	vww
031	3629	3624	41	w	233	6179	—	6	—
313	3683	3681	66	m	224	6202	6204	26	vww
131	3727	(3743)	12	(w)	712	6248	—	61	—
230	3751	—	21	—	414	6257	6267	76	w
601	3793	3792	9	vw	800	6264	—	19	—
610	3897	—	26	—	613	6325	6336	12	vww
512	3899	3898	23	m	141	6339	—	22	—
403	3994	—	3	—	240	6363	6370	24	vww
123	4019	—	90	m+	523	6368	—	14	—
231	4020	4020	27	—	801	6534	—	1	—
422	4138	—	0	—	721	6558	6568	34	vww

Table 1 (cont.).

hkl	$10^4 \sin^2 \theta$ calc	$10^4 \sin^2 \theta$ obs	I calc	I obs	hkl	$10^4 \sin^2 \theta$ calc	$10^4 \sin^2 \theta$ obs	I calc	I obs
2 4 1	6633 }		34 }		5 1 4	7137 }		3	
8 1 0	6637 }	6636	2 }	vw	2 0 5	7137 }	(7150)	21	(vw)
3 3 3	6668	6675	59	vw	1 4 2	7149 }		8	
3 2 4	6691	(6697)	31	(vw)	6 3 1	7152 }		34	
5 0 4	6764	6763	9	vw	1 1 5	7217 }		0	
1 0 5	6844	(6830)	2	(vw)	7 0 3	7224 }	7220	42	vw
6 3 0	6882 }		22 }		8 0 2	7343 }		7	
5 3 2	6885 }	6869	23 }	vw	4 3 3	7354 }	7345	3	vw
8 1 1	6907	6907	67	vw +	7 2 2	7368 }		7	
0 4 2	7051	(7043)	1	(vw)	4 2 4	7376 }	7366	1	vw
0 1 5	7119 }		55 }		2 4 2	7443	—	4	—
3 4 1	7122 }	7123	10 }	vw	6 2 3	7445	—	0	—

The horizontal lines mark the boundaries between the angular ranges of the three different focusing cameras used.

Reflections systematically absent according to D_{2h}^{16} have been omitted. Reflections coinciding with α_2 or β reflections are given in brackets.

The intensities were calculated from the expression $100 \cdot \frac{p}{8} \left(\frac{F}{4f_U} \right)^2$, where p is the number of equivalent reflections.

had to be determined geometrically. This was done in the same way for $U(OH)_2SO_4$, making the same assumptions with the exception that the minimum permissible U—O distance was assumed to be 2.36 Å as in UO_2 (which has the CaF_2 -structure. GOLDSCHMIDT and THOMASSEN 1923, ZACHARIASEN 1948). The atomic coordinates arrived at in this way for the oxygen and sulphur atoms were, within the limits, the same as for $Th(OH)_2SO_4$.

When the positions of the light atoms had been found, a redetermination of the parameters for the uranium atoms was made using trial and error methods and taking into account the scattering power of the light atoms. The best agreement was then obtained with the values first tried for the parameters, i.e. $x_U = 0.064$ and $z_U = 0.148$, the same as for the metal ions in $Th(OH)_2SO_4$.

In Tables 2 and 3 the calculated values of $100 \left(\frac{F}{4f_U} \right)^2$ are compared with the observed intensities in the WEISSENBERG photographs $h0l$ and $h1l$.

The following structure is thus proposed for $U(OH)_2SO_4$:

D_{2h}^{16} — $Pnma$, 4 formula units in the unit cell.

	x	y	z
4 U in 4(c).....	0.064 ± 0.003	0.25	0.148 ± 0.005
4 S ₁ in 4(c).....	0.36	0.25	0.95
8 O _U (OH) in 8(d)	0.41	0 ± 0.03	0.39
4 O ₁ in 4(c)	0.47	0.25	0.05
4 O ₂ in 4(c)	0.27	0.25	0.10
8 O ₃ in 8(d)	0.35	0.05	0.83

4(c) = $\pm (x, \frac{1}{4}, z)$; $\pm (\frac{1}{2} + x, \frac{1}{4}, \frac{1}{2} - z)$

8(d) = $\pm (x, y, z)$; $\pm (\frac{1}{2} + x, \frac{1}{2} - y, \frac{1}{2} - z)$; $\pm (\bar{x}, \frac{1}{2} + y, \bar{z})$; $\pm (\frac{1}{2} - x, \bar{y}, \frac{1}{2} + z)$.

Table 2

Calculated and observed intensities $h\ 0\ l$ from a WEISSENBERG photograph of $\text{U}(\text{OH})_2\text{SO}_4$.

Cu K radiation.

$$I_{\text{calc}} = 100 \cdot \left(\frac{F}{4f_{\text{U}}} \right)^2.$$

	$h \rightarrow$														
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
0	—	—	46 m+	—	7 vw	—	52 m	—	74 m	—	62 m-	—	1	—	88 m+
1	—	18 vw	44 w	13 vw	41 w	15 vw	18 vw	61 m	1	25 w	36 w	1	83 m	5	29 w
2	2 vww	4 vww	2 vww	40 w	0	110 m	5	13 vww	13 vww	21 vw	2	69 m-	1	64 m	4
3	—	85 m+	4 vww	18 vw	5 vww	21 vw	1	83 m	1	64 m-	5 vww	7 vww	16 vw	17 vw	—
4	98 st	4 vww	31 w	34 w	0	18 vw	53 m-	1	74 m	7 vww	24 w	28 w	4	33 m-	—
5	—	3 vww	42 w	0	104 st	2 vww	61 m	0	0	1	64 m+	0	85 st	—	—
6	50 w+	12 vw	26 w-	30 w	0	18 vw	22 vw	4 vww	61 m+	2 vww	30 w+	—	—	—	—
7	—	92 st	16 vw	10 vw	3	18 vw	0	79 m+	0	71 st	—	—	—	—	—
8	8 vw	6 vw	9 vw	79 st	0	92 st	—	—	—	—	—	—	—	—	—

The accuracy of the sulphur and oxygen parameters is estimated to be about ± 0.03 . The parameters for the sulphur and oxygen atoms differ by at most 0.01 from those found in $\text{Th}(\text{OH})_2\text{SO}_4$. The metal ions, however, have the same parameters in both structures.

Description of the structure

Fig. 1 shows the xy and xz projections of the structure of $\text{U}(\text{OH})_2\text{SO}_4$. The metal and hydroxyl ions form zig-zag chains running along the y axis in the unit cell. The shortest U—U distance within such a chain is only 3.90 Å, which is very close to the shortest U—U distances in UO_2 (= 3.87 Å). Though the determination of the U—O distances is very uncertain, this resemblance may indicate that the U—O bonds in $\text{U}(\text{OH})_2\text{SO}_4$ and UO_2 are essentially the same, *i.e.* they should be mainly ionic. In this way the structure of $\text{U}(\text{OH})_2\text{SO}_4$ is closely related to those of $\text{Th}(\text{OH})_2\text{SO}_4$ (LUNDGREN 1950) and $\text{Th}(\text{OH})_2\text{CrO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ (LUNDGREN and SILLÉN 1949), both of which contain $\text{Me}(\text{OH})_2$ chains with mainly ionic Me—OH bonds.

In the crystals of $\text{U}(\text{OH})_2\text{SO}_4$ the chains are connected by sulphate ions. The coordination U—O obtained in this way is eightfold in the shape of a square Archimedean antiprism, a coordination which is to be expected for ions of this radius ratio (PAULING 1940).

Table 3

Calculated and observed intensities $h\ 1\ l$ from a WEISSENBERG photograph of $U(OH)_2SO_4$.

Cu K radiation.

$$I_{\text{calc}} = 100 \cdot \left(\frac{F}{4 f_U} \right)^2.$$

		$h \rightarrow$													
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
$l\ 0$ $\downarrow$	—	—	21 w	—	112 st	—	51 m—	—	4 —	—	86 m	—	71 m	—	42 m
	61 m	19 vw	30 w	38 w	1 —	24 w—	44 w	4 vvw	67 m—	1 —	22 vw	35 w—	1 —	37 w+	33 w+
2	—	81 m+	10 vw	6 vvw	8 vvw	23 vw	3 —	61 m—	0 —	83 m	1 —	10 vvw	13 vvw	25 vw	
3	12 vw	13 vw	2 vvw	66 m	3 vvw	76 m	12 vvw	8 vvw	15 vw	26 w—	2 —	85 m	0 —	59 m+	
4	—	25 vw	38 w+	10 vvw	76 m	3 —	27 w	40 w	0 —	23 w—	42 w+	1 —	67 m+		
5	110 m	0 —	38 w+	0 —	3 —	1 —	51 w+	0 —	83 m	0 —	50 m				
6	—	30 w	34 w	15 vw	58 w+	5 vvw	28 vw	52 w+	0 —	35 m					
7	1 —	10 vvw	6 vvw	74 m+	1 —	81 m+	4 —	10 vw							
8	—	77 m+	17 w	4 vvw											

The distances U—O, S—O and O—O (within a sulphate group) were assumed to be 2.3_6 Å, 1.4_7 Å and 2.4_0 Å respectively. The distances between oxygen atoms not belonging to the same sulphate group would be (in Å):

$$O_U-3\ O_U = 2.5_8, 2 \times 2.9_6$$

$$O_U-O_1, O_1-2\ O_U = 2.8_8$$

$$O_U-2\ O_2, O_2-4\ O_U = 2.9_4, 2.9_8$$

$$O_U-3\ O_3, O_3-3\ O_U = 3.0_5, 3.1_2, 3.1_8$$

$$O_1-2\ O_1 = 2 \times 3.1_2$$

$$O_1-2\ O_3, O_3-O_1 = 2 \times 2.8_6$$

$$O_2-2\ O_3, O_3-O_2 = 2 \times 2.7_6$$

These figures are all within the normal range, showing that the lattice is also supported by O—O contacts. However, because of the difficulty in determining the oxygen parameters, they may be in error by a few 0.1 Å.

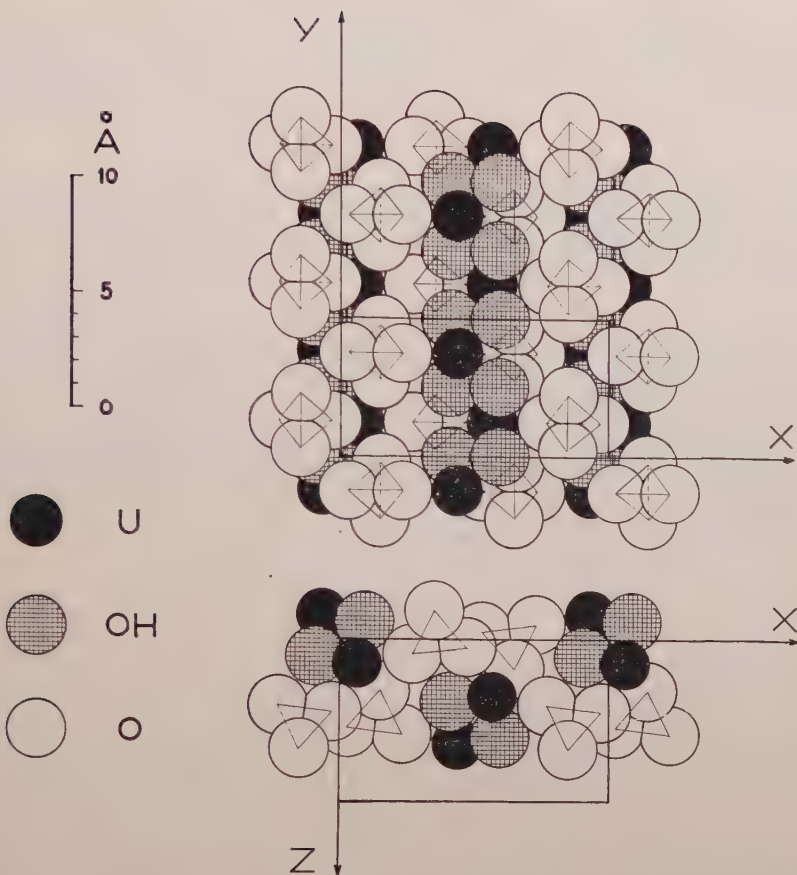


Fig. 1. Projections on the xy and xz planes of the structure of $\text{U}(\text{OH})_2\text{SO}_4$.

The author wishes to thank Professor ARNE ÖLANDER for his kind interest in this work. He is also indebted to Professor LARS GUNNAR SILLÉN for many valuable discussions, and to Professor GUSTAF LJUNGGREN for kindly supporting this work.

Part of the work was aided by a grant from Atomkommittén.

SUMMARY

A new compound, $\text{U}(\text{OH})_2\text{SO}_4$, isomorphous with $\text{Th}(\text{OH})_2\text{SO}_4$, has been prepared. It is orthorhombic with the cell dimensions

$$a = (11.572 \pm 0.005) \text{ \AA}$$

$$b = (5.926 \pm 0.005) \text{ \AA}$$

$$c = (6.969 \pm 0.005) \text{ \AA}$$

$$V = 477.9_0 \text{ \AA}^3$$

The unit cell contains four formula units.

A structure is proposed with atomic positions in D_{2h}^{16} — $P nma$ (cf. page 424). The atomic parameters were determined as previously described for $Th(OH)_2SO_4$ (LUNDGREN 1950). The crystals are built up of $U(OH)_2$ chains, linked together by sulphate ions.

Försvarets forskningsanstalt, Avd. 1

Department of Inorganic and Physical Chemistry, University, Stockholm.

Department of Inorganic Chemistry, Royal Institute of Technology, Stockholm.

REFERENCES. **Brush, G. J.** (1868) Amer. J. Sci. 460, 240. — **Gmelin's** Handbuch der anorganischen Chemie, 8. Aufl. (1936) Berlin, Systemnummer 55, page 151. — **Goldschmidt, V. M. and Thomassen, L.** (1923) Vid. Selsk. Skr. Mat. Nat. Klasse (Kristiania) no 2; Strukturbericht 1, 212. — **Hartwig-Bendig, M.** (1941) Z. angew. Miner. 3, 195. — **Hecht, F. and Donau, J.** (1940) Anorganische Mikrogewichtsanalyse, Wien, page 205. — **Kolthoff, I. M. and Sandell, E. B.** (1943) Textbook of Quantitative Inorganic Analysis, New York, page 753. — **Lundgren, G.** (1950) Arkiv för Kemi 2, 535. — **Lundgren, G. and Sillén, L. G.** (1949) Arkiv för Kemi 1, 277; Naturwiss. 36, 345. — **Pauling, L.** (1940) The Nature of the Chemical Bond, 2 ed., New York, page 382. — **Penfield, S. L.** (1894) Amer. J. Sci. (3) 48, 30; Z. anorg. Chem. 7, 22. — **Zachariasen, W. H.** (1948) Phys. Rev. 73 (Ser. II), 1104.

Tryckt den 5 september 1952

Uppsala 1952. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

Use of ion exchangers for the determination of the velocity of the alkali catalyzed hydrolysis of amides

By SIGVARD WIDEQVIST

Several methods have been used for the analysis of reaction mixtures in the hydrolysis of amides. The saponification of amides is entirely analogous to the saponification of esters:



There is, however, one important difference between these two reactions. In the first process the alkali disappears, and the progress of the reaction may be followed quite simply by titration of samples of the reaction mixture against standardized hydrochloric acid. But in the second process the amount of titratable alkali is constant during the reaction, as ammonia is substituted for the equivalent amount of the sodium hydroxide which disappears.

In previous investigations the analysis of the reaction mixture was based on determination of the ammonia evolved during the reaction. The following methods have been employed: I) When the reaction was performed at a higher temperature, the ammonia was distilled off at intervals and titrated with hydrochloric acid. CASON and WOLFHAGEN (1). II) When the hydrolysis was performed at room temperature, the excess alkali was suppressed by addition of magnesium sulfate, and the ammonia was then distilled off and titrated. REID (2). III) The mixture was neutralized and treated with formaldehyde, whereupon hexamethylenetetramine was produced with the liberation of an equivalent amount of acid, which could be titrated. VI) The reaction mixture was treated with sodium hypobromite. The ammonia was then oxidized to nitrogen, which was measured in an azotometer. PESKOFF and MEYER (3). The excess sodium hypobromite can also be estimated by titration. v. EULER and ÖLANDER (4).

None of these methods is convenient, however, and except for the volumetric method they are not even fairly exact. A new method of analysis, using cation exchangers, is introduced in the present investigation.

Samples of the reaction mixture are simply allowed to flow through an ion exchanger containing Amberlite IR 120, when the following process takes place:



The liberated acid is then titrated with sodium hydroxide. This method is very accurate when applied to slow reactions. With fast reactions the method is not so exact, as some time is required for the sample of the reaction mixture to flow through the ion exchanger, and the hydrolysis of the amide continues during this operation.

The usefulness of the method is illustrated by the saponification of acetamide by sodium hydroxide at 25° C.

The hydrolysis is a second-order reaction, and the rate constant is calculated according to the equation

$$k = \frac{1}{(a-b)t} \ln \frac{b(a-x)}{a(b-x)} \quad (1)$$

or

$$k = \frac{x}{a(a-x)t} \quad (2)$$

when $a = b$. The mean values of k were calculated according to the method of least squares. From two series of measurements the values $k = 0.1344$ and $k = 0.1341$ were obtained with time in hours and a and b in mole/liter. PESKOFF and MEYER (3) obtained $k = 0.1349$ and 0.1340 with the volumetric method.

The method was also applied to the hydrolysis of succinamic acid.

Experimental

The hydrolysis of acetamide. Acetamide (Schering-Kahlbaum, "für wissenschaftliche Zwecke") was used without further purification. The temperature was kept constant at 25° C by a water thermostat with a Vertex-regulator. Samples were taken with a 10-ml pipette and allowed to pass through an ion exchanger containing Amberlite IR 120. The liberated acetic acid was titrated with 0.1143-n sodium hydroxide and phenolphthalein as indicator. The results are shown in Tables I and II.

Table I

The hydrolysis of acetamide at 25° C.

$[\text{CH}_3\text{CONH}_2] = a = 0.2003$; $[\text{NaOH}] = b = 0.1098$.

t_{hours}	x	$a - x$	$b - x$	k
0		0.2003	0.1098	
1.00	0.0045	1958	1053	0.1684
1.75	58	1945	1040	1327
4.67	126	1877	972	1352
10.50	261	1742	837	1346
24.17	478	1525	620	1349
29.67	542	1461	556	1345
49.00	708	1295	390	1342
72.33	832	1171	266	1344

Mean value 0.1344

Table II

The hydrolysis of acetamide at 25° C.

$$[\text{CH}_3\text{CONH}_2] = [\text{NaOH}] = a = 0.2064.$$

t_{hours}	x	$a - x$	k
0		0.2064	
1.50	0.0090	1974	0.1399
5.00	252	1812	1346
13.50	560	1504	1335
25.00	844	1220	1340
33.00	984	1080	1337
49.00	1187	877	1338
52.00	1218	846	1341

Mean value 0.1341

The hydrolysis of succinamic acid. The succinamic acid was prepared from succinic anhydride by the method of JEFFERY and VOGEL (5). The hydrolysis was performed as above, and samples were taken with a 5-ml pipette. The results are shown in Table III.

Table III

The hydrolysis of succinamic acid at 25° C.

$$[\text{H}_2\text{NCO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COONa}] = [\text{NaOH}] = a = 0.1023.$$

t_{hours}	x	$a - x$	k
0		0.1023	
5	0.0054	969	0.1090
24	191	832	0935
48	338	685	1005
76.25	452	571	1015
96	508	515	1004
121.67	577	446	1039
168	649	374	1010
192	675	347	0992
216	701	322	0985
264	747	276	1002

Mean value 0.1008

Acknowledgment

The author is indebted to Laborator F. NYDAHL for placing the ion exchangers at his disposal.

S U M M A R Y

The velocity of the alkaline hydrolysis of acetamide and succinamic acid has been determined at 25° C. The reaction mixture was analyzed by means of cation exchangers. This method, which is very convenient and precise, seems not to have been employed before for this purpose.

Laboratory of Organic Chemistry, University of Uppsala.

REFERENCES: 1. **Cason** and **Wolffhagen**, *J. Org. Chem.*, *14*, 155 (1949). — 2. **Reid**, *Am. Chem. J.*, *45*, 331 (1911). — 3. **Peskoﬀ** and **Meyer**, *Z. physik. Chem.*, *82*, 153 (1913). — 4. **v. Euler** and **Ölander**, *Z. physik. Chem.*, *131*, 116 (1928). — 5. **Jeﬀery** and **Vogel**, *J. Chem. Soc.*, *1934*, 1101.

Tryckt den 5 september 1952

Uppsala 1952. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

Über die Natur der Stärkegrenzdextrine

1. Die theoretisch möglichen Grenzdextrine

Von KARL MYRBÄCK

Mit 4 Figuren im Text

Es ist lange bekannt, dass bei der Hydrolyse von Stärke und Glycogen durch die gewöhnlichen Amylasen aus tierischen Organen, höheren Pflanzen (Malz), Schimmelpilzen und Bakterien immer Maltose als Hauptprodukt gebildet wird, dass aber die „Verzuckerung“ selten oder nie in dem Sinne vollständig ist, dass die Polysaccharide zu 100 % in normal vergärbare Zucker umgewandelt werden. Rechnet man die bei der Hydrolyse freigesetzten, reduzierenden Gruppen in Maltose um, so zeigt sich, dass bei den verschiedenen Amylasen die Spaltung bei Verzuckerungsgraden weit unter 100 % aufhört oder jedenfalls sehr stark verlangsamt wird. So bleibt die Spaltung der gewöhnlichen Stärken durch die β -Amylase schon bei einer (wirklichen) Maltoseausbeute von rund 60 % stehen, und bei den verschiedenen α -Amylasen hört die Spaltung bei (scheinbaren) Maltoseausbeuten von 70–90 % auf oder verlangsamt sich jedenfalls so stark, dass die Reaktion in Versuchen mit mässigen Enzymmengen bei den erwähnten Spaltungsgraden praktisch aufhört. Bei den Spaltungen durch die α -Amylasen entstehen neben Maltose und wenigstens in einigen Fällen Glucose die sog. *Grenzdextrine*, die von normalen, lebenden Hefen nicht oder in Einzelfällen ausserordentlich langsam angegriffen werden.

Über die Ursachen der unvollständigen Verzuckerung und der Bildung der Grenzdextrine waren die Vorstellungen, in dem Masse wie solche überhaupt existierten, selbstverständlich sehr unklar, so lange noch die Auffassungen über die Chemie der Substrate schwankend und zum Teil falsch waren. Dann wurde aber, besonders durch Arbeiten von H. STAUDINGER und seiner Schule, klargestellt, dass die Moleküle der Stärke (und anderer Polysaccharide) Macromoleküle sind, in welchen die Grundkörper, d. h. die Monosaccharidreste, durch normale Glykosidbindungen verknüpft sind. Im Falle der Stärke wurde von HAWORTH und anderen ausser Zweifel gestellt, dass die α -glucosidische 1,4-Bindung, die „Maltosebindung“, das Hauptprinzip des Baues ist und dass weiter die Moleküle im Mittel etwa 4,5 % Endgruppen enthalten. Bekanntlich verteidigte HAWORTH lange die Auffassung, dass *nur* Maltosebindungen in der Stärke vorkommen und dass also das Stärkemolekül eine einfache Kette von 20–25 Glucoseres ten ist, die durch Maltosebindungen verknüpft sind. Versucht man nun auf Basis dieser Vorstellung den enzymatischen Abbau der Stärke zu verstehen und eine Erklärung für den unvollständigen Abbau und die

Bildung der Grenzextrine zu finden, so stösst man auf unüberwindbare Schwierigkeiten. Verf. wurde deshalb dazu geführt (1), in der Stärke auch andere Bauelemente als die Maltosebindung zwischen den Glucoseresten anzunehmen. Es wurde angenommen, dass die Wirkung der Amylasen in einer Spaltung von Maltosebindungen besteht, dass aber in den Stärkemolekülen „Anomalien“ vorkommen, die irgendwie die Enzymwirkung in ihrer Nähe verhindern. Dabei wurde in erster Linie an ein Vorkommen anderer Glucosidbindungen als die Maltosebindung gedacht. In Erwägung wurde auch gezogen, dass die anomalen Glucosidbindungen eine Verzweigung der Polysaccharidketten bedeuten könnten. Von ganz anderen Erwägungen ausgehend kamen STAUDINGER und Mitarbeiter (2) etwa gleichzeitig zu einer ähnlichen Auffassung vom Bau der Stärke.

Die esterartig gebundene Phosphorsäure gewisser Stärkesorten ist zweifelsohne eine Anomalie, die die enzymatische Hydrolyse der Polysaccharide beeinflusst (vgl. POSTERNAK (3)). Ihre Menge ist aber so klein, dass nur ein kleiner Teil der tatsächlich entstehenden Grenzextrine durch ihre Wirkung entstanden sein kann. Es musste also geschlossen werden, dass die Grenzextrinbildung in der Hauptsache mit dem Vorhandensein anderer Anomalien als die Estergruppen zusammenhängt. Es konnte dann gezeigt werden, dass alle untersuchten Grenzextrine ausser einigen Maltosebindungen immer eine andere Glucosidbindung, und zwar eine α -glucosidische 1,6-Bindung („Isomaltosebindung“), enthalten (4). Die Ausbeuten an Grenzextrinen und die gefundenen Molekulargewichte derselben ermöglichte eine Berechnung, dass in den gewöhnlichen Stärkesorten 4–5 % Isomaltosebindungen vorhanden sind. Die Anzahl dieser Bindungen stimmt also mit der Endgruppenzahl gut überein, woraus der Schluss gezogen werden kann, dass alle oder jedenfalls fast alle Verzweigungspunkte der Kettenmoleküle Isomaltosebindungen sind. Das Vorkommen der Isomaltosebindungen und der verzweigte Bau der Moleküle ist auch auf anderen Wegen bewiesen worden (5).

Es hat sich gezeigt, dass die gewöhnlichen Stärkesorten zwei prinzipiell verschiedenen gebaute Polysaccharide enthalten, die Amylose und das Amylopectin, von denen die Amylose nicht verzweigte Moleküle mit lauter Maltosebindungen hat, das Amylopectin dagegen verzweigte Moleküle mit etwa 5 % Isomaltosebindungen. Die Amylose gibt beim enzymatischen Abbau Maltose und kleinere Mengen von Glucose und Maltotriose. Da letztere durch gewöhnliche Hefe vergoren wird, wird sie nicht zu den Grenzextrinen gerechnet. Diese entstehen also bei der Stärkespaltung ausschliesslich aus dem Amylopectin. Das Glycogen enthält nur verzweigte Moleküle und gibt ebenfalls Grenzextrine.

Die Auffassung, dass die Anomalien der Stärke- bzw. Glycogenmoleküle die Ursache der Grenzextrinbildung sind, hat sich völlig durchgesetzt; alle modernen Untersuchungen über die Wirkung der Amylasen gehen davon aus. Es sollte aber nicht verschwiegen werden, dass die obige Beweisführung die Annahme voraussetzte, dass die Amylasen keine synthetisierende Wirkung haben, oder in anderen Worten, dass die Grenzextrine wirklich herausgespaltene Bruchstücke der Amylopectinmoleküle sind und nicht etwa durch Synthese bzw. Transglucosidierung gebildete sekundäre Produkte. Ein *Umkehr* der amylatischen Hydrolyse ist aber nie beobachtet worden. Die Annahme, dass die Amylasen Maltosebindungen unter *gleichzeitiger* Bildung von Isomaltosebindungen spalten, d. h. eine Umglucosidierung bewirken könnten, erschien unwahrscheinlich, obgleich schon in einem Fall, nämlich dem der sog. Maceransamylase, eine Umglucosidierung angenommen werden musste (6). Später hat sich ergeben, dass eine ganze Gruppe von Enzymen, die sog. Transglucosidasen, existiert, deren Wirkung in der Überführung eines Monosaccharid-

restes aus einer Verbindung auf eine andere besteht (7). In letzter Zeit ist auch gefunden worden, dass wenigstens in einigen natürlichen Materialien derartige Transglucosidasen zusammen mit Amylasen vorkommen (8). Es gibt z. B. tatsächlich Enzyme, die aus Maltose Isomaltose und das Trisaccharid mit je einer Maltose- und einer Isomaltosebindung bilden können (9). Man muss sich selbstverständlich fragen, ob derartige Umglucosidierungen für die Grenzextrinbildung ganz oder teilweise verantwortlich sein können. Die Antwort ist, dass bei den gewöhnlichen Amylasen eine Transglucosidasenwirkung wenn überhaupt nur eine sehr untergeordnete Rolle spielen kann. Lässt man gereinigte Amylasen auf Maltose einwirken, so tritt keine bestimmbar Bildung anderer Saccharide ein. Weiter ist die Auffassung vom Bau der Polysaccharide, die auf den Beobachtungen über die amylytische Hydrolyse fusst, so vollständig mit den Ergebnissen ganz andersartiger Untersuchungen im Einklang, dass es als völlig bewiesen angesehen werden kann, dass die Eigentümlichkeiten, die beim amylytischen Abbau von Amylopectin und Glycogen beobachtet werden, mit dem verzweigten Bau, d. h. mit dem Vorkommen der Isomaltosebindungen in den Polysacchariden zusammenhängt, so dass jede Isomaltosebindung die Entstehung eines Grenzextrinmoleküls veranlasst. (Es erscheint nicht ganz ausgeschlossen, dass in Ausnahmefällen ein Grenzextrinmoleküle zwei Isomaltosebindungen enthalten kann; siehe weiter unten.)

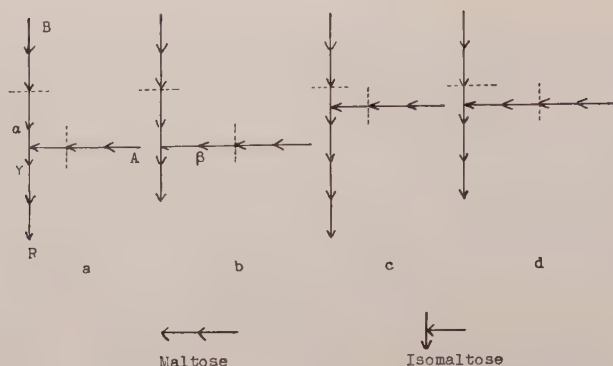
Es sei hier nur kurz darauf hingewiesen, dass die heutige Auffassung vom Bau des Amylopectins bzw. des Glycogens auch mit den Ergebnissen der Untersuchung des umkehrbaren *phosphorolytischen* Abbaues ebenfalls im Einklang ist.

Auch wenn es feststeht, dass das Amylopectin etwa 5% Isomaltosebindungen enthält, die Verzweigungspunkte der Moleküle bilden, so bleibt die Frage bestehen, ob die Verzweigung der Moleküle regelmässig oder unregelmässig ist. Diese Frage kann wohl noch nicht als endgültig beantwortet betrachtet werden; mehrere Gründe scheinen indessen für eine unregelmässige und wiederholte Verzweigung zu sprechen. Für die folgenden Ausführungen ist aber ohne Belang, ob die Verzweigung regelmässig oder unregelmässig ist.

Alles spricht dafür, dass die eigentlichen Amylasen nur Maltosebindungen, nicht aber die Isomaltosebindungen spalten können. Der Umstand, dass gewisse Amylasepräparate (wie z. B. die Takadiastase) unter Umständen eine vollständige oder fast vollständige Zerlegung von Stärke in Glucose bewirken können, dürfte so zu deuten sein, dass die betreffenden Präparate nicht nur Amylase sondern auch Maltase und noch ein Enzym („Grenzextrinase“) enthalten, das die 1,6-Bindungen (in Isomaltose, vielleicht auch in höheren Sacchariden) spalten kann.

Inwieweit die Maltasen α -glucosidische 1,6-Bindungen angreifen können, ist eine Frage für sich. Die Existenz von „1,6-Glucosidasen“ in Muskel (10) und Kartoffel (11) ist auf alle Fälle bewiesen. Nehmen wir aber an, dass die eigentlichen Amylasen gegenüber den Isomaltosebindungen inaktiv sind, so folgt, dass die Isomaltosebindungen in Amylopectin und Glycogen die Bildung der Grenzextrine verursachen, und die Frage erhebt sich dann, wieviele Glucosereste die Grenzextrinmoleküle enthalten und, wenn darin ausser den Isomaltosebindungen auch Maltosebindungen vorhanden sind, wie die Lagen der verschiedenen Bindungen sind im Verhältnis zu einander.

Wie man sich auch die Verzweigung der Amylopectin- bzw. Glycogenmoleküle denkt, so wird allgemein angenommen, dass die Längen der einzelnen Ketten um bestimmte Mittelwerte variieren. Bedenkt man, dass die Ketten aus den Monomeren (Glucose-1-phosphat) aufgebaut werden, so erscheint es notwendig anzunehmen, dass sowohl Ketten mit einer geraden wie solche mit einer ungeraden Anzahl von Glucoseresten vorkommen. Ausserdem wird allgemein angenommen, dass bei der Spaltung

Fig. 1. Verschiedene Typen von verzweigten α -Dextrinen.

der verzweigten Polysaccharide die Ketten zwischen den Verzweigungspunkten bzw. zwischen Verzweigungspunkt und Endgruppe zwar zunächst ziemlich in der Mitte aber doch zu einem gewissen Grade wahllos gesprengt werden. Es entstehen also bei der primären „Dextrinierung“ des Amylopectins durch die α -Amylasen verzweigte α -Dextrine mit einem mittleren Polymerisationsgrade von etwa 9 Glucoseeinheiten. Diese Zahl wurde bei direkter Bestimmung des mittleren Molekulargewichts der verzweigten α -Dextrine gefunden (12), und lässt sich ausserdem aus der mittleren Länge der Innenketten des Amylopectins berechnen (etwa 6 Glucoseeinheiten (13)). Schematisch können diese Dextrine durch die Formeln der Fig. 1 veranschaulicht werden. In diesen und den folgenden Abbildungen bedeutet der Pfeil ein Glucoserest; die Pfeilspitze ist das Kohlenstoffatom 1 der Glucose. Die Formeln der Maltose bzw. Isomaltose zeigen wie die 1,4- bzw. 1,6-Bindungen veranschaulicht werden. In den verzweigten α -Dextrinen können nun alle drei Ketten eine gerade oder ungerade Zahl von Glucoseresten enthalten. R ist die reduzierende Endkette, während die Ketten A und B nicht reduzierende Endgruppen besitzen. Bei der weiteren Spaltung der α -Dextrine werden nun sicher zunächst aus den nicht reduzierenden Endketten A und B Maltosemoleküle abgespalten, so wie in der Abbildung 1 angedeutet. Diese Abspaltung wird sogar von der β -Amylase bewirkt, und wahrscheinlich kann sie von allen Amylasen hervorgerufen werden. Möglich aber nicht wahrscheinlich erscheint, dass eine α -Amylase aus nicht reduzierenden Endketten (bei α bzw. β in der Fig. 1) Maltotriose abspalten kann, da die α -Amylasen unserer Erfahrung nach Bindungen dicht an Verzweigungen oder an Endgruppen nicht oder nur sehr schwierig angreifen. Was bei der Spaltung durch α -Amylase mit der reduzierenden Endkette R geschieht, ist nicht völlig klar; die β -Amylase hat aber auf alle Fälle keine Wirkung. Dass aber eine α -Amylase z. B. aus dem Dextrin 1a (bei γ in der Figur 1) ein Molekül Maltose abspalten kann, erscheint wahrscheinlich. Rechnen wir zunächst nur mit einer Abspaltung von Maltose, so sollten die in der Abbildung 2 veranschaulichten „primären“ Grenzdextrine entstehen können.

Dass gewisse Amylasen aus Stärke ausser Maltose auch Glucose als primäres Spaltprodukt bilden, wurde schon früh beobachtet (14). Nachdem dieser Glucosebildung lange Zeit keine Aufmerksamkeit gewidmet wurde, wurde sie wiederentdeckt (15). Wir werden in einer folgenden Arbeit darauf zurückkommen. Eine Abspaltung von Glucose aus einigen der in der Figur 2 abgebildeten Dextrine erscheint

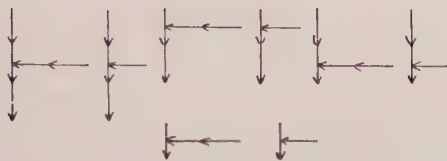


Fig. 2. Primäre Grenzdestrine.

nicht undenkbar. Neulich hat K. H. MEYER (16) ein Schema des amylatischen Endabbaues angegeben, in welchem angenommen wird, dass aus Dextrinen wie in der Fig. 2 Glucose sowohl aus der reduzierenden wie aus den nicht reduzierenden Endketten abgespalten wird, so dass schliesslich als das einzige endgültige Grenzdestrin Isomaltose entsteht. Nehmen wir an, dass die Stärke 4,5 % Isomaltosebindungen enthält, so sollte, wenn die Isomaltose das einzige Grenzdestrin ist, die Ausbeute an Grenzdestrin etwa 9 % sein.

Da bei der Umwandlung eines Polysaccharids in Disaccharide eine Ausbeute von etwa 106 % berechnet wird, so würde bei einer derartigen enzymatischen Hydrolyse mindestens 96 % vergärbare Zucker (viel Maltose - wenig Glucose) gebildet werden. Schon früh wurde aber wie erwähnt gefunden, dass die Spaltung der Stärke durch die Amylasen wesentlich früher aufhört als bei einer Maltoseausbeute von 96 %. Dabei ist ausserdem zu beachten dass, wie oben erwähnt, jedenfalls gewisse α -Amylasen nicht nur Maltose (und Grenzdestrine) geben sondern auch Glucose. Die Anwesenheit von Glucose wird, wenn die Reduktion wie gewöhnlich in Maltose umgerechnet wird, einen zu hohen Wert des scheinbaren Verzuckerungsgrades geben.

Viele Verfasser haben festgestellt, dass die amylatische Spaltung bei einer (scheinbaren) Maltoseausbeute aufhört oder jedenfalls ausserordentlich stark verlangsamt wird, die bei 70-80 % liegt. Praktisch wird bei diesen Verzuckerungsgraden eine *Verzuckerungsgrenze* erreicht. Ebenso wurde festgestellt, dass wenn die Amylasewirkung praktisch zum Stillstand gekommen ist und die unvergärbaren Grenzdestrine isoliert werden, so ist erstens die Totalausbeute an Grenzdestrinen viel höher als 9 % (oft 20 % und mehr) und zweitens zeigen Fraktionierungsversuche, dass unter den Grenzdestrinen oft solche mit 3 und 4 Glucoseresten vorherrschen (12).

In Arbeiten aus diesem Laboratorium wurde wiederholt darauf hingewiesen, dass Versuche über die Isolierung von Grenzdestrinen oft nicht sehr gut reproduzierbar sind, da sowohl die Totalausbeute an Grenzdestrinen wie das Molekulargewicht der einzelnen Fraktionen mit dem angewendeten Enzympräparat, der Enzymmenge, der Versuchszeit usw. etwas variiert. Auch wurde gefunden, dass die isolierten Dextrinfraktionen nicht immer gegenüber dem angewendeten Enzympräparat absolut widerstandsfähig sind, dass aber die Geschwindigkeit ihrer weiteren Spaltung im Verhältnis zu der der Stärkespaltung durch dasselbe Enzym äusserst klein ist (1/1000 und weniger). Die Frage wurde dabei offen gelassen, ob die beobachtete langsame Spaltung der Grenzdestrine durch die eigentlichen Amylasen oder durch spezielle Dextrinasen verursacht wird. Inwieweit dies der Fall ist, lässt sich im allgemeinen noch nicht sagen. Dass es „Grenzdestrinasen“ gibt, ist aber ganz klar. Eine solche wurde sogar neulich in kristallisierter Form gewonnen (17). Über den Spaltungs- bzw. Spezifitätsbereich des Enzyms ist bis auf weiteres sehr wenig bekannt. Die „Amylo-1,6-glucosidase“ von CORI (10) sowie das 1,6-Bindungen spaltende Enzym von HOBSON, WHELAN und PEAT (11) wären wohl auch gewissermassen zu den „Grenzdestrinasen“ zu rechnen.

Wir wollen augenblicklich nicht zur Frage Standpunkt nehmen, ob, wie von MEYER (16) angenommen wird, alle α -Amylasen als schliessliches Grenzextrin nur Isomaltose geben. In einigen Fällen wurde dies experimentell gefunden (18), und es mag sein, dass diese Spaltung den α -Amylasen allein zuzuschreiben ist. Andererseits ist neulich von ROBERTS und WHELAN (19) angegeben worden, dass die Speichelamylase nicht einmal Maltotriose zu spalten vermag. Es erscheint deshalb äusserst unwahrscheinlich, dass dieses Enzym Glucose aus Grenzextrinen mit 3 Glucose-resten (Figur 2) abspalten könnte. Aber wo auch der wirkliche Endzustand liegt, so lässt er sich nur mit grossen Enzymmengen und nach langen Versuchszeiten erreichen. Offenbar ist ausser den Isomaltosebindungen auch eine gewisse Zahl von Maltosebindungen nicht oder nur schwer spaltbar. Was wir betonen wollen ist, dass wenn auch alle die für die Bildung der Isomaltose als einziges Grenzextrin in Frage kommenden Maltosebindungen gespalten werden *können*, so werden einige von ihnen leicht, andere schwer oder gar nicht angegriffen, und zwar scheint, wie wir mehrmals hervorgehoben haben, diese feinere Spezifität nicht bei allen zu den α -Amylasen gehörigen Enzymen dieselbe zu sein. Es gibt also bei diesen Enzymen eine *relative Spezifität*. Es ist aber leicht verständlich, dass in Versuchen mit sehr grossen Enzymmengen, die schnell zum Endzustand führen, diese relative Spezifität nicht zum Ausdruck kommt.

Es sei weiter betont, dass mit den hier besprochenen Fragen, insbesondere mit der Bildung der niedrigmolekularen Grenzextrine, die von MEYER und seiner Schule stark hervorgehobene Retrogradation (20) der Substrate nichts zu tun hat. Es ist leicht zu zeigen, dass bei den Spaltungsversuchen mit α -Amylasen das Substrat vollständig in niedermolekulare Dextrine zerfällt; höhermolekulare Reste der Substrate, die z. B. von Jod gefärbt werden sollten, sind völlig abwesend. Sogar aus der Amylose, die am leichtesten retrogradiert, entstehen nur niedrigmolekulare Dextrine (21). Die Grenzextrine entstehen nur aus dem nicht oder nur langsam retrogradierenden Amylopectin (bzw. Glycogen). Dass beim Arbeiten mit den Polysacchariden als Substrat die eventuelle Spaltung der Grenzextrine durch die in grossen Mengen anwesende Maltose bis zu einem gewissen Grade gehemmt wird, ist selbstverständlich anzunehmen.

Verfolgt man den zeitlichen Verlauf der Spaltung der Stärke mit einer α -Amylase, so findet man, dass die hohe Anfangsgeschwindigkeit nach Erreichen eines mehr oder weniger hohen Spaltungsgrades stark abnimmt, d. h. die noch ungespaltenen Bindungen werden schwieriger angegriffen. Bei der α -Malzamyrase ist der Übergang von den leicht zu den schwer spaltbaren Bindungen schärfer als bei den anderen α -Amylasen (26). Mit dem Malzenzym findet man, dass im Amylopektin 1/6–1/7 der Bindungen schnell gespalten werden. Neben kleinen Mengen von vergärbaren Zuckern entstehen dabei hauptsächlich α -Dextrine mit 6–10 Glucoseeinheiten. Fraktionierung und Untersuchung der Fraktionen hat gezeigt, dass aus den verhältnismässig langen Endketten des Amylopektins (wie aus der Amylose) die sog. normalen α -Dextrine ohne Verzweigungen und mit etwa 6–7 Glucoseeinheiten entstehen, während aus den Innenketten des Amylopektins (zwischen den Verzweigungspunkten) die anomalen, verzweigten α -Dextrine mit einem Polymerisationsgrad von etwa 8–10 Einheiten hervorgehen (12). Die anomalen α -Dextrine, aus welchen also die Grenzextrine hervorgehen, haben prinzipiell den in der Figur 1 veranschaulichten Bau. Die weitere Spaltung dieser Dextrine durch die α -Malzamyrase geht viel langsamer als die Dextrinierung des Amylopektins; bei anderen α -Amylasen ist der Unterschied weniger auffallend. MYRBÄCK und JOHANSSON (22) konnten zeigen, dass die ziemlich jäh eintretende Verlangsamung der Spaltung durch die

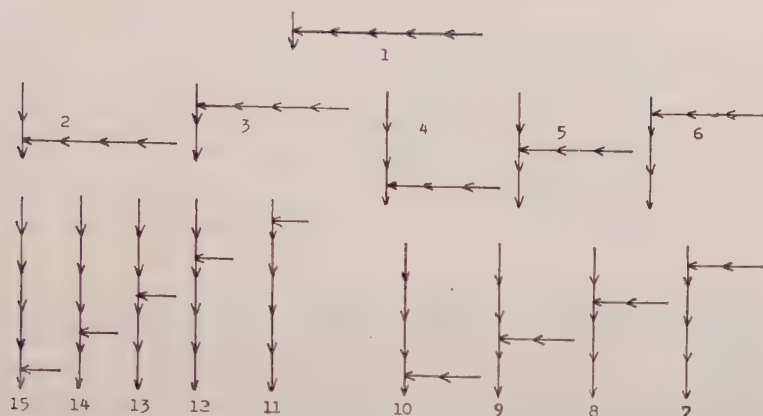


Fig. 3. Die möglichen, einfach verzweigten Hexasaccharide.

α -Malzamyrase bei einem Spaltungsgrad von rund 16 % damit zusammenhängt, dass das Enzym eine sehr hohe Affinität zu langkettigen Sacchariden hat, dagegen eine sehr viel niedrigere zu kurzkettigen Sacchariden. Ähnliche Verhältnisse wurden bei der Spaltung der Amylose gefunden; nur lag in diesem Falle die Grenze bei einem Spaltungsgrade von etwa 22 % (relative Zahl der gespaltenen Bindungen). Zu ganz ähnlichen Ergebnissen ist SCHWIMMER (23) gekommen. K. H. MEYER (24) behauptet dagegen, dass die Spaltung der Amylose mit α -Malzamyrase bis zu einem Spaltungsgrad von etwa 45 % rasch verläuft, um dann viel langsamer zu werden. Die langsame Reaktion wird als eine Spaltung der Maltotriose betrachtet, und die von uns gefundenen Spaltkurven, die bei 16 bzw. 22 % abbiegen, werden als von einer Retrogradation der Substrate bedingt betrachtet. Dass dies aber keineswegs der Fall sein kann, haben wir schon gezeigt. Wir wollen weiter bemerken, dass die Versuche MEYERS mit so grossen Enzymmengen und auch sonst so angeordnet sind, dass die Form der Spaltungskurve in den ersten Stadien überhaupt nicht festgestellt werden kann. MEYER hat selbst unseren Befund bestätigt, dass die Affinität des Enzyms zu langen Kettenmolekülen viel höher ist als zu kurzen (16, 23). Die Ursache der niedrigen Spaltungsgeschwindigkeit der an sich spaltbaren Maltosebindungen in den kurzkettigen Sacchariden ist, dass die Endgruppen bzw. die Verzweigungen der Moleküle die Anlagerung des Enzyms erschweren. Eine schematische Deutung dieser Verhältnisse wurde a. a. O. gegeben (24). Es mag sein, dass wenigstens bei einigen α -Amylasen einige Maltosebindungen nahe an den Isomaltosebindungen völlig unspaltbar sind; darüber kan jedoch augenblicklich keine bestimmte Aussage gemacht werden; sehr oft findet man jedenfalls, wie schon erwähnt, bei Fraktionierung der Grenzdextrine solche mit 3–6 Glucoseeinheiten. Offenbar ist deshalb jedenfalls in gewissen Hexasacchariden die Spaltungsgeschwindigkeit der Maltosebindungen schon sehr stark herabgesetzt.

Von verzweigten Hexasacchariden mit einer Isomaltosebindung sind 15 möglich (Figur 3). Von diesen können 1–6, 9, 10, 13–15 durch die β -Amylase unter Abspaltung von Maltose abgebaut werden, und es dürfte angenommen werden können, dass alle α -Amylasen dieselbe Wirkung entfalten können. Von den 15 möglichen Hexasacchariden sind deshalb 11 schon aus diesem Grunde undenkbar als Bestandteile der Grenzdextrine. Dabei sollte jedoch bemerkt werden, dass z. B. im Hexa-

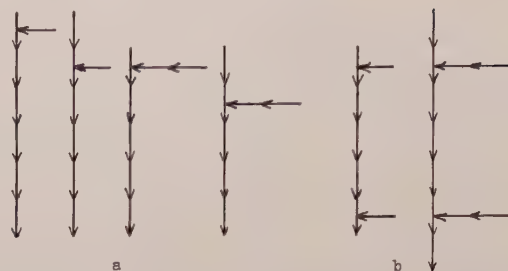


Fig. 4. a) Durch die β -Amylase nicht spaltbare, einfach verzweigte Heptasaccharide. b) Doppelt verzweigte Dextrine.

saccharid 1 die zweite spaltbare Bindung wahrscheinlich wesentlich schwieriger gesprengt wird als die erste.

In ähnlicher Weise findet man, dass von den 10 möglichen einfach verzweigten Pentasacchariden 4, von den 6 Tetrasacchariden ebenfalls 4 und von den Trisacchariden alle drei gegenüber der β -Amylase stabil sind. Man sieht leicht ein, dass dies auch für diejenigen höheren Saccharide gibt, die aus den hier besprochenen durch Verlängerung der reduzierenden Endkette hervorgehen. In der Figur 4 a sind die entsprechenden Heptasaccharide veranschaulicht.

Nimmt man eine völlig unregelmässige Verzweigung des Amylopectins bzw. des Glycogens an, so können auch weitere Typen primärer Grenzdextrine erwartet werden, nämlich solche, die pro Molekül mehr als eine Verzweigung enthalten. Die mittlere Länge der Innenketten dürfte beim Amylopectin etwa 5–6, beim Glycogen etwa 3 Einheiten sein. Es wäre deshalb zu erwarten, dass Ketten mit 2 und 3 Einheiten nicht allzu selten sind. Die in der Figur 4 b veranschaulichten, zweimal verzweigten Grenzdextrine könnten also eventuell entstehen. Von der β -Amylase werden sie nicht angegriffen und von den α -Amylasen wahrscheinlich nur schwierig, von einigen vielleicht gar nicht.

Inwieweit die α -Amylasen vermögen, aus der reduzierenden Endkette der primären Grenzdextrine *Maltose* abzuspalten, wissen wir nicht. Es erscheint aber nicht unwahrscheinlich, dass dies in dem theoretisch möglichen Ausmasse geschieht. Wenn dies der Fall ist, so sollten die in der Figur 2 veranschaulichten sekundären Grenzdextrine entstehen, die von den Amylasen nur durch eventuelle Abspaltung von *Glucose* weiter abgebaut werden können. Wenn also die Spaltung so vor sich geht wie oben angenommen und keine *Glucose* abgespalten wird, so sollten unter den Grenzdextrinen keine höheren Saccharide als Pentasaccharide vorkommen, wenn wir von mehrfach verzweigten Dextrinen absehen.

Dass die verschiedenen α -Amylasen (aus Tierorganen, höheren Pflanzen, Pilzen und Bakterien) stofflich verschieden sind, geht ja aus vielen modernen Arbeiten hervor, in welchen die Darstellung der kristallisierten Enzyme beschrieben und vielfach auch eine weitgehende Charakterisierung der isolierten Proteine gegeben wurde (6). Trotz der stofflichen Verschiedenheit der α -Amylasen ist angenommen worden, dass sie auf die Substrate dieselbe Wirkung haben. Dies ist aber wie erwähnt nicht der Fall. Die verschiedene Wirkung hängt offenbar mit der oben besprochenen relativen Spezifität der α -Amylasen zusammen. Um über diese Spezifität, d. h. die Fähigkeit eines Enzyms eine Maltosebindung bestimmter Lage in einem (ver-

zweigigen oder nicht verzweigigen) Saccharid zu spalten, Aufschluss zu bekommen, ist es offenbar notwendig, die Natur der von den verschiedenen Enzymen erzeugten Grenzextrakte festzustellen bzw. die Wirkung der Enzyme auf Extrakte bestimmten Baues zu untersuchen. Beide Aufgaben sind nur schwierig durchführbar, besonders weil die Darstellung genügender Mengen einheitlicher Extrakte von bekannter Konstitution schwierig und zeitraubend ist. Vor allem ist über die Trennung verschiedener Extrakte desselben Polymerisationsgrades fast nichts bekannt.

LITERATUR. 1. Myrbäck, K., *Current Sci. India* 6, 47 (1937); Myrbäck, K. und Ahlborg, K., *Svensk kem. tid.* 49, 216 (1937). — 2. Staudinger, H. und Husemann, E., *Ann.* 527, 195 (1937); *Ber.* 71, 1057 (1938). — 3. Posternak, Th., *Helv. Chim. Acta* 18, 1351 (1935). — 4. Siehe z. B. Myrbäck, K. und Ahlborg, K., *Biochem. Z.* 307, 69 (1940). — 5. Vgl. Kerr, R. W., *Chemistry and Industry of Starch*, 2. Aufl. Academic Press, New York 1950. — 6. Siehe Zusammenfassung in Sumner, J. B. und Myrbäck, K., *The Enzymes*, Academic Press, New York 1950, Seite 721. — 7. Hassid, W. Z., Doudoroff, M. und Barker, H. A. in Sumner—Myrbäck: *The Enzymes*, p. 1014. — 8. Pigman, W. W., *J. Res. Natl. Bur. Standards* 33, 105 (1944); Pan, S. C., Andreasen, A. A. und Kolachow, P., *Science*, 112, 115 (1950); Pan, S. C., Nicholson, L. W. und Kolachow, P., *J. Am. Chem. Soc.* 73, 2547 (1951). — 9. Pazur, J. H. und French, D., *J. Am. Chem. Soc.* 73, 3536 (1951). — 10. Petrova, A. N., *Doklady Akad. Nauk. SSSR* 53, 431 (1947); Cori, G. T. und Larnier, J., *J. Biol. Chem.* 188, 17 (1951). — 11. Hobson, P. N., Whelan, W. J. und Peat, S., *J. Chem. Soc.* 1950, 3566; *Biochem. J.* 47, x (1950). Vgl. auch Maruo, B. und Kobayashi, T., *Chem. Researches Japan* 7, 47; zitiert nach C. A. 44, 10017 b. — 12. Myrbäck, K., *Advances in Carbohydrate Chem.* 3, 251 (1948). — 13. Myrbäck, K. und Sillén, L. G., *Svensk kem. tid.* 55, 311 (1943). — 14. Ling, A. R., *J. Inst. Brewing*, 9, 446 (1902); Davis, B. F. und Ling, A. R., *J. Chem. Soc.* 85, 16 (1904). — 15. Myrbäck, K., *Biochem. Z.* 307, 140 (1941). — 16. Meyer, K. H. und Gonon, W. F., *Helv. Chim. Acta* 34, 294 und 308 (1951). — 17. Underkofler, L. A. und Roy, D. K., *Cereal Chem.* 28, 18 (1951). — 18. Montgomery, E. M., Weakley, F. B. und Hilbert, G. E., *J. Am. Chem. Soc.* 71, 1682 (1949). — 19. Roberts, P. J. P. und Whelan, W. J., *Biochem. J.* 49, lvi (1951). — 20. Siehe beispielsweise Meyer, K. H., Bernfeld, P., Boissonnas, R. A., Gürtler, P. und Noelting, G., *J. Phys. and Colloid Chem.* 53, 319 (1949). — 21. Myrbäck, K. und Thorsell, W., *Svensk kem. tid.* 55, 178 (1943). — 22. Myrbäck, K. und Johansson, N. O., *Arkiv Kemi, Mineral. Geol.*, 20 A, Nr 6 (1945). — 23. Siehe z. B. Meyer, K. H. und Bernfeld, P., *Helv. Chim. Acta* 24, 359 E (1941). — 24. Myrbäck, K., *Arkiv Kemi* 2, 417 (1950).

Tryckt 29 september 1952

Uppsala 1952. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB



Zur Kenntnis des Buttergelb-Hepatomes und seiner Entstehung I

VON BETH VON EULER, HANS VON EULER und HANS HASSELQUIST

I. Einfluss der Cancerisierung auf den Gehalt von Ratten-Organen an Ergonen und Enzymen

Auf die in Tumor-tragenden Tieren bestehende *Verminderung* der Oxydations-Katalysatoren Cytochrom c, Cytochrom-Oxydase und Diaphorase¹ und ihre Bedeutung für den Stoffwechsel in Tumoren hat der eine von uns wiederholt hingewiesen².

Neben dem besonders wichtigen System Cytochrom-Diaphorase spielt ein weiteres Redox-System, dessen zentrales Glied die *Ascorbinsäure* ist, eine wesentliche Rolle. Wie T. FUJIWARA, W. NAKAHARA und S. KISHI³ fanden, ist die Ascorbinsäure (und gleichzeitig Glutathion) in den malignen Leberzellen des Hepatoms gegenüber den normalen Leberzellen *vermehrt*. Zum gleichen Ergebnis kamen später DYER und ROSS.⁴

Was speciell das Ascorbinsäure-System in Organen von Ratten betrifft, in deren Leber sich nach Eingabe von Buttergelb Hepatome entwickeln, so ist der Ascorbinsäure- und Glutathion-Gehalt etwa der gleiche wie in der normalen Organen (abgesehen von der Milz). ROBERTSON⁵ sowie DYER und ROSS⁴ betonen die grossen Unterschiede im Ascorbinsäure-Gehalt der Tumoren verschiedener Herkunft; im Vergleich hierzu sind die Unterschiede im Ascorbinsäure-Gehalt der Organe normaler und canceröser Ratten gering.

Schon BORSOOK u. MITARB.⁶ gaben an, dass in Organen normaler Ratten die Dehydro-Ascorbinsäure schnell zu Ascorbinsäure reduziert wird. ROE und MILLS⁷ fanden in den Geweben normaler Tiere keine oder nur unbedeutende Mengen von Dehydro-Ascorbinsäure (DHAs) und von Diketogulonsäure (DKG). Den gleichen Befund erhoben bezüglich Tumor-tragender Mäuse DYER und ROSS.⁴ Über die

¹ EULER u. H. HELLSTRÖM, Dieses Arkiv 13 B Nr 1; 1938. — Zs. physiol. Chem. 255, 159 und 260, 163; 1938/39.

² B. v. EULER u. H. v. EULER, Zs. f. Krebsforsch. 57, 501; 1951. — Siehe hierzu auch P. G. SEEGER, Zs. f. Krebsforsch. 57, 387; 1951. — W. NAKAHARA u. F. FUKUOKA, Gann, 40, 45; 1949.

³ T. FUJIWARA, W. NAKAHARA u. S. KISHI, Gann, 32, 107; 1938.

⁴ H. M. DYER u. H. E. ROSS, Journ. Nat. Cancer Inst. 11, 313; 1950.

⁵ W. V. ROBERTSON, Journ. Nat. Cancer Inst. 4, 321; 1943. — Siehe auch Konzentrationsbestimmungen d. Ascorbinsäure in Tumoren von GALIGANI, citiert nach P. RONDONI, Il Cancro (Milano 1946), S. 418.

⁶ H. BORSOOK, H. W. DAVENPORT, C. E. P. JEFFREYS a. R. C. WARNER, J. Biol. Chem. 117, 237; 1937. — Siehe auch G. E. WOODWARD, Biochem J. 29, 2405; 1935.

⁷ J. H. ROE, M. B. MILLS, M. J. OESTERLING a. C. M. DANROM, J. Biol. Chem. 174, 201; 1948.

Reversibilität der DHAs und über das Gleichgewicht DHAs Glutathion siehe BORSOOK u. Mitarb.⁶

Über die Beziehungen der Ascorbinsäure zu ihren Oxydationsprodukten DHAs und DKG sei hier, unter Hinweis auf eine vorhergehende Mitteilung⁸ nur folgendes bemerkt:

DHAs wird durch H_2S oder $SnCl_2$ leicht zu Ascorbinsäure zurückreduziert.⁹ Durch Einwirkung von Alkali wird der Laktoring geöffnet und es entsteht die entsprechende Diketosäure die sich nun nicht mehr in Ascorbinsäure zurückverwandelt. Aus der Diketogulonsäure kann, besonders unter der Einwirkung von Anilin, 1 Mol. CO_2 abgespalten werden. Anilin-Derivate der DHAs sind kürzlich von einen von uns¹⁰ beschrieben worden. Die Diketogulonsäure schliesst sich also in dieser Hinsicht den niedrigeren α -Ketosäure an, besonders der Brenztraubensäure, deren Decarboxylierung von LANGENBECK¹¹ eingehend studiert wurde.

Die CO_2 -Abspaltung aus Diketogulonsäure tritt indessen nicht nur durch Vermittlung von Anilin bzw. von Aminen ein, sondern auch (schwächer) in alkalischer Lösung ohne Zusatz von Stickstoffbasen. Eine reaktionskinetische Untersuchung der Decarboxylierung von α -Ketosäuren ist im Gang.¹²

Der Enzymgehalt der Organe Tumor-tragender Tiere ist in diesem Institut wiederholt untersucht worden. Zahlreiche Versuche betrafen die am Brenztraubensäure-Gleichgewicht beteiligten Enzyme; gemessen wurde der Gehalt des Blutes der cancerösen Tiere an Brenztraubensäure (BTS); derselbe stieg in Ratten mit grossen Sarkomen bis auf das 4-fache des normalen.

Über den Einfluss verschiedener Tumoren auf die Katalase-Wirkung der Leber hat GREENSTEIN¹³ eingehende Versuche angestellt und konnte über grosse Effekte berichten. Auch bei den durch Buttergelb hervorgerufenen Hepatom-Lebern tritt, u. zw. in Mitochondrien, die Katalase-Erniedrigung ein. Bemerkenswert ist, dass sich diese Erniedrigung deutlich bemerkbar macht schon bevor die Hepatom-Bildung makroskopisch nachweisbar ist, wie folgender Versuch zeigt:

Ratten unseres Stammes erhielten vom 5. Dezember 1951 an täglich Gaben von Buttergelb per os und zwar in Olivenöl gelöst, einpipettiert. Grundkost siehe S. 447.

Unmittelbar nach Dekapitation des Tieres wurde die Leber entnommen, in üblicher Weise extrahiert und die Katalase-Wirksamkeit durch Ermittlung von 14 Kat f (Titration des unverbrauchten H_2O_2 mit Kaliumpermanganat bei 0° ; Reduktion der Reaktionskonstanten auf das Trockengewicht) festgestellt. Das gleiche Verfahren wurde zum Vergleich auf die Leber einer gleich alten normalen Ratte angewandt.

Ratten der Tabelle 1	Normal	Nach Eingabe von 900 mg Buttergelb
Totalgewicht der Leber	8,0 g	12,5 g
Zur Katalase-Best. verwendet, trocken	53,9 mg	42,8 mg

⁸ EULER u. H. HASSELQUIST, *Dieses Arkiv* 4, No 7; 1952.

⁹ Siehe J. R. PENNEY a. S. S. ZILVA, *Biochem. J.* 37, 403; 1943. — 39, 1; 1945.

¹⁰ H. HASSELQUIST, *Dieses Arkiv*, 4, No 24, 1952. In diesem Zusammenhang mag noch erwähnt werden, dass o-Chinon die Ascorbinsäure zu DHAs oxydiert.

¹¹ W. LANGENBECK, *Die organ. Katalysatoren u. ihre Beziehung zu Fermenten*. Berlin, Springer 1945.

¹² An Glucosaccharosensäure hat OHLE (*Chem. Ber.* 67, 555; 1934) eine analoge CO_2 -Abspaltung erwähnt.

¹³ J. P. GREENSTEIN u. Mitarb., *J. Nat. Cancer Inst.* 1, 687; 1941. — 2, 17-525; 1942. — 3, 397; 1943.

¹⁴ EULER u. JOSEPHSON, *Chem. Ber* 56, 1749; 1923. — 59, 770; 1926.

Tabelle 1

Leber	Minuten	$a - x$	$k \cdot 10^4$	$k \cdot 10^4$ Mittel	Kat _f
Normal	0	12,50	—	} 185	} 343
	5	9,90	202		
	10	8,15	186		
	15	7,00	168		
Nach Eingabe von 900 mg Butter- gelb	0	11,70	—	} 81	} 189
	5	10,55	90		
	10	9,85	75		
	15	6,95	79		

II. Das per os eingegebene Buttergelb im Rattenkörper

Nachdem YOSHIDA¹⁵ die spezifische cancerogene Wirkung des o-Amino-azotoluols auf die Rattenleber beschrieben und mit SASAKI¹⁶ eingehend studiert hatte, entdeckte KINASATO¹⁷ den wesensgleichen aber noch deutlicheren Hepatom-erzeugenden Effekt des Dimethylaminoazobenzols. Man fand bei diesem besonders interessanten Azofarbstoff nach Eingabe per os¹⁸ ganz ähnliche Folge-Erscheinungen wie beim o-Amino-azotoluol, aber die Tumoren treten nach einer kürzeren Latenzperiode, 70–130 Tagen, auf.

Wir gehen hier nicht auf die histologische Verfolgung der Entwicklungsstadien des Rattenhepatoms ein. Bemerkt sei nur, dass das entsprechende Hepatom durch Buttergelb auch an Mäusen hervorgerufen werden kann (MIZUTA und MARUYA), nicht aber an Kaninchen.

Die neueren Untersuchungen von DRUCKREY und KÜPFMÜLLER¹⁹ sowie die daran anknüpfenden Erwägungen und Schlüsse von BUTENANDT und DRUCKREY haben die Aufmerksamkeit wieder auf die Fähigkeit dieses und anderer²⁰ Azofarbstoffe gelenkt, Hepatome an Ratten und Mäusen hervorzurufen. An ihrem Rattenstamm haben DRUCKREY und KÜPFMÜLLER gefunden, dass der Leberkrebs bei fortgesetzter Buttergelb-Fütterung der Ratten in dem Zeitpunkt auftritt, in dem die applizierte Gesamtdosis einen kritischen Wert von etwa 1 000 mg per Ratte überschreitet, wobei es gleichgültig ist, auf welchen Zeitraum diese Dosis verteilt

¹⁵ T. YOSHIDA, Proc. Imp. Acad. Tokyo, 8, 464; 1932.

¹⁶ T. SASAKI u. T. YOSHIDA, Virchows Archiv, 295, 175; 1935.

¹⁷ R. KINOSITA, Gann, 34, 165; 1940.

¹⁸ Einführung der cancerogenen Azofarbstoffe durch Injektion führte bei Ratten nicht zur Bildung eines Hepatomas, vermutlich wegen der zu schnellen Ausscheidung.

¹⁹ H. DRUCKREY und K. KÜPFMÜLLER, Zs. f. Naturforsch. 3 b, 254; 1948.

²⁰ Was diese anderen Azofarbstoffe betrifft, die hier nicht besprochen werden, so sei nur auf die lehrreiche Monographie von A. LACASSAGNE (Radiophysiologie expérimentale. Cancer et Hormones, vol. V u. VI, 1946/47) verwiesen. Ferner auf neuere Arbeiten von CHR. HACKMANN (Zs. Krebsforsch. 57, 530; 1951) sowie H. DRUCKREY (Acta Union Intern. contre le Cancer, vol. VII, No 1, 1950). Ferner: K. SUGIURA, C. R. HALTER, C. J. KENSLEY u. C. P. RHOADS, Cancer Res. 5, 235; 1945.

wird, da die Effekte der einzelnen Gaben sich verlustlos auf die Lebensdauer summieren. Während man aber nach DRUCKREY u. BUTENANDT die völlige dauernde Irreversibilität des als Summationsgift wirkenden Buttergelbes als sichergestellte Tatsache anzusehen hat, ist der *Mechanismus* und die *Biochemie* dieser cancerogenen Wirkung noch in wesentlichen Zügen ungeklärt.

Man kann zunächst die Angaben von KINASATO bestätigen, dass der durch hohe Färbekraft ausgezeichnete Azofarbstoff vor oder während der Cancerisierungsperiode im Harn und in der Leber nur in ganz kleinen Mengen erscheint. Hierzu muss allerdings bemerkt werden — worauf HEEP und ANDO aufmerksam gemacht haben — dass die Wirkung des Buttergelbs im Rattenkörper von der Diät, insbesondere von Proteinen und Riboflavin (MILLER *et. al.*²¹) in hohem Grad beeinflusst wird. Sodann sind weitere wichtige Befunde von MILLER u. MILLER²² zu erwähnen:

Sie stellten aus den Lebern der mit Buttergelb behandelten Ratten ein Pulver dar, das zu wenigstens 97% aus Eiweiss und Nukleoproteinen bestand. In diesem Pulver fanden die genannten Autoren das Buttergelb *gebunden*. Sie konnten daneben keinen freien Farbstoff nachweisen. Das gebundene Buttergelb konnte durch Kochen des Pulvers mit organisch Lösungsmitteln oder durch heisse Trichloressigsäure nicht entfernt werden. Nur durch längere tryptische oder alkalische Hydrolyse gelang es, den Azofarbstoff in Freiheit zu setzen.

Der alkalisch abgetrennte Farbstoff liess sich in p-Monomethyl-Amino-azobenzol und p-Amino-azobenzol fraktionieren; die dann noch übrigen 90% des angewandten Pulverstoffes wurden von MILLER u. MILLER noch nicht identifiziert.

Auch das Monomethyl-amino-azobenzol ist cancerogen; nach Eingabe per os wird es in der Leber ebenfalls gebunden.

Bemerkenswert ist die Angabe, dass in solchen Rattengeweben, die keinen Tumor erzeugen, also in Darm, Nieren, Milz, Lunge, Herz und Skelettmuskel, das Buttergelb *nicht* gebunden wird.

In der Periode der Buttergelb-Fütterung fanden MILLER und MILLER nach 4–6 Wochen ein Maximum des gebundenen Farbstoffes, darauf eine Abnahme. Wurde die Buttergelb-Zugabe eingestellt, so fiel die Menge gebundenen Farbstoffes innerhalb 2 Wochen beinahe auf 0.

Fest steht somit, dass ein grosser Teil des per os eingeführten Azofarbstoffes an einen Leberbestandteil gebunden wird, und also als solcher aus dem Organismus verschwindet. Es erhebt sich nun die Frage, welche Veränderung das Buttergelb dabei erleidet, in welcher Periode dieselben eintreten und welche Wirkungen der veränderte Farbstoff im Organismus ausübt.

Dass im Rattenorganismus eine Spaltung des Dimethylamino-azobenzols in einem noch unbestimmten Grad eintritt, geht aus einer Untersuchung von STEVENSON, DOBRINER und RHOADS²³ hervor, welche p-Aminophenol und p-Phenylendiamin unter den Spaltprodukten nachwiesen, aber über die Rolle derselben an der Tumorerzeugung keine Angaben machen können. „How far the metabolic products isolated or possible intermediary products formed in the course of metabolism of dimethyl-aminoazobenzene may account for the formation of liver hepatomas remains to be clarified.“

²¹ J. A. MILLER u. C. A. BAUMANN, *Cancer Research* 5, 227; 1945. — K. SUGIURA, *Cancer Research*, 8, 141; 1947/48. Bezgl. B₁₂: Day, Payne, Dinning, *Proc. Soc. exp. Biol. u. Med.* 74; 1950.

²² E. C. MILLER u. J. A. MILLER, *Cancer Research*, 7, 468; 1947.

²³ E. S. STEVENSON, K. DOHSNER u. C. P. RHOADS, *Cancer Res.* 2, 160; 1941.

Tiermaterial

Über die Versuchstiere ist folgendes mitzuteilen:

Der norwegische Stamm weisser Ratten des Vitamin-Institutes erhielt in der ersten Versuchsserie unsere gewöhnliche, wiederholt beschriebene Grundkost, in welche (ausser der Salzmischung und den Vitaminen) 2,5 % Hefe, 15 % Trockenmilchpulver und 35 % Kleie eingeht.

Wegen der S. 446 schon erwähnten Hemmung der Hepatom-Bildung (MILLER u.a.) durch Proteine und Riboflavin²⁴ erhielten dann die Ratten Trockenbrot (Wasa spisbröd) und zwar nicht mehr ad libitum sondern 8 g per Tag und Ratte und 2 g frische Mohrrüben-Scheiben. Dazu kam per Tag 1 ml Olivenöl, in welchem das Dimethylamino-azobenzol gelöst war. Zu Anfang der Versuchsserien erhielten die Tiere, die rund 100 g wogen, 10 mg per Tag, nach 70 Tagen 30 mg.

Äussere Syntome machten sich nicht bemerkbar, abgesehen von einzelnen Fällen von Haarausfall am Hals nach etwa 60 Versuchstagen.

In einer Ratte, die nach 10 Tagen dekapitiert wurde, schienen die inneren Organe normal mit Ausnahme der Milz, deren äussere Schicht tief dunkelrot, fast schwarz war, während sie im Inneren normales Aussehen zeigte.

Aus unseren Versuchen geht in Übereinstimmung mit den früheren Angaben hervor, dass das freie Buttergelb aus dem Organismus in rel. kurzer Zeit, etwa 2-3 Tagen, verschwindet. Ein Teil wird durch den Harn ausgeschieden.

Nach täglichen Dosen von 10 mg Buttergelb wurde der Tagesharn der Ratten gesammelt; er war gelb, die Farbtintensität entsprach aber kaum mehr als etwa 0,2 mg Buttergelb.

Durch Äthylacetat konnte nur wenig Buttergelb extrahiert werden. Auch wenn der wässrige Rückstand mit Alkali erwärmt wurde trat nur eine schwache Farbenreaktion auf, die auf Zusatz von Säure nicht wesentlich verstärkt war.

Aus der Publikation von MILLER u. MILLER²² geht nicht deutlich hervor, wie sie neben der von ihnen beschriebenen Bindung des Buttergelbs und des Monomethylamino-azobenzols die von STEVENSON et al.²³ gefundene Spaltung des Azofarbstoffes in Anilin und Phenylendiamin berücksichtigt haben.

Unsere weiteren Versuche sind durch 2 Fragestellungen veranlasst:

Ist die Krebserzeugung (die mutagene Wirkung) hervorgerufen

1 a) durch das Auftreten des Buttergelbs (oder eines Buttergelb-Derivates) im Organismus und proportional mit diesem,

1 b) durch die Verbindung des Buttergelbs mit einem spezifischen selbstreproduzierenden Nukleoproteid, also einer Virus-artigen Substanz; in diesem Fall wäre die Buttergelb-Wirkung mengenmässig begrenzt durch die Menge der Virus-artigen Substanz im Organismus bezw. in der Leber,

oder aber

2) ist es eine *Reaktion* (etwa Elektronen-Verschiebung) am Buttergelb (Bindung oder Spaltung), begleitet von einer Energie-Entwicklung, welche die eigentliche Ursache der mutagenen Wirkung ist?

²⁴ Riboflavin scheint bei dieser Hemmung ebenso wie [nach hiesigen Befunden, Z. physiol. Chem. 225; 1934] bei Milchsäurebakterien und bei den in Buttergelb-Lebern stark verminderten Mitochondrien als (KCN-unempfindlicher) Oxydations-Katalysator zu wirken.

III. Reaktionen des Dimethylamino-azobenzols in vitro

Für eine nähere Einsicht in die Rolle des Buttergelbs im Organismus erschien es notwendig, festere Anhaltspunkte über das chemische Geschehen an diesem Azofarbstoff und besonders über seine Angreifbarkeit durch Enzyme und durch die in Betracht kommenden Ergone, Ascorbinsäure, Glutathion u. a. zu gewinnen.

Wir haben also eine Reihe von Versuchen mit frischen Organbreien, besonders dem der Leber sowie mit Blutserum angestellt.

Frische Leber einer Ratte, die 600 mg Buttergelb in 66 Tagen erhalten hatte, wurde unmittelbar nach Dekapitierung fein zerrieben und mit einer Olivenöl-Lösung von 20 mg Buttergelb versetzt. Der Mischung wurden nach 4 Stunden und nach 20 Stunden Proben entnommen. Dieselben wurden zunächst mit Alkohol extrahiert, wobei ein wesentlicher Teil des angewandten Buttergelbs in Lösung ging. Um über die Art der Absorption einen Aufschluss zu gewinnen, wurde der Rückstand noch weiter mit Alkohol behandelt, wobei etwa 50 % des Buttergelbs in Lösung gingen.

Der Rückstand wurde mit Alkali erwärmt um den gefundenen Anteil des Azofarbstoffes zu erfassen. Es zeigte sich aber, das dadurch höchstens noch 10% des Buttergelbs gewonnen wurden.

Die weitere Prüfung bezog sich auf die eventuellen Spaltprodukte u. zw. besonders auf p-Phenylendiamin. Für den Nachweis desselben wurde eine neue Reaktion verwendet, die der eine von uns (H. HASSELQUIST) ausgearbeitet hat: die Koppelung mit Triose-Redukton. Dieses liefert ein Produkt von ausserordentlich hoher Färbekraft.

Analoge Versuche wurden mit Blutserum angestellt und lieferten den Nachweis der Anwesenheit von p-Phenylendiamin.

Die Arbeit wurde mit Unterstützung von LOTTEN BOHMANS FOND und von KONUNG GUSTAF V:s JUBILEUMS-FOND ausgeführt, wofür wir zu grossem Dank verpflichtet sind.

Stockholm. Universität, Institut für organ.chem. Forschung und Vitamin-Institut.

Tryckt den 29 september 1952

Uppsala 1952. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

Some contributions to the technique of analyzing polysaccharides with particular reference to animal mucopolysaccharides

By SVEN GARDELL

This treatise is a summary of the following nine papers.

- I. GARDELL, S.: A Colorimetric Method for the Determination of Monosaccharides in Organic Solvents for Use in Partition Chromatography. *Acta. Chem. Scand.* 5, 1011, 1951.
- II. GARDELL, S.: Chromatographic Separation and Quantitative Determination of Monosaccharides. *Acta Chem. Scand.* 7, 201, 1953.
- III. CARLANDER, A., and GARDELL, S.: An Automatic Fraction Collector. *Arkiv f. Kemi*, bd 4 nr 35.
- IV. GARDELL, S., GORDON, A. H., and ÅQVIST, S.: Electrophoresis of Mucopolysaccharides in a Slab of Hyflo Super-Cel. *Acta Chem. Scand.* 4, 907, 1950.
- V. BOSTRÖM, H., and GARDELL, S.: Uptake of Sulphates in Mucopolysaccharides Esterified with Sulphuric Acid in the Skin of Adult Rats after Intraperitoneal Injection of S³⁵-labelled Sodium Sulphate. *Acta Chem. Scand.* 7, 216, 1953.
- VI. GARDELL, S., HEIJKENSKJÖLD, F., and ROCH-NORLUND, A.: Oxidation of Glucosamine and Galactosamine with Ninhydrin to Arabinose and Lyxose and their Identification with Paper Chromatography. *Acta Chem. Scand.* 4, 970, 1950.
- VII. GARDELL, S.: Note on the Crystallization of Chondrosamine. *Acta Chem. Scand.* 5, 195, 1951.
- VIII. GARDELL, S.: Separation on Dowex 50 Ion Exchange Resin of Glucosamine and Galactosamine and their Quantitative Determination. *Acta Chem. Scand.* 7, 207, 1953.
- IX. DRAKE, B., and GARDELL, S.: Chromatography Combined with Automatic Recording of Electrolytic Conductivity. II. The Analysis of a Mixture of Glucosamine and Galactosamine. *Arkiv f. Kemi*, bd 4 nr 36.

References to these papers will be made with Roman figures I—IX.

Introduction

An essential step in the analysis of a polysaccharide is to identify the single monosaccharides occurring in it. Because of the difficulty of obtaining the polysaccharides in a pure state free from other polysaccharides and because of their rather heterogeneous high molecular structure they are not characterized by physical constants but rather by their content of various monosaccharide units. In many instances, such as when dealing with neutral polysaccharides

containing a number of monosaccharides it may prove impossible to reach any conclusion about the composition of the single molecular units. In other cases, e. g. with mucopolysaccharides, only a few components are present and they occur in definite equivalent amounts, indicating a homogeneity in the structure of the polysaccharide. In any case the qualitative and quantitative analysis of the single sugar components occurring in a polysaccharide is of paramount importance for its characterization.

The extensive older literature on the analysis and identification of carbohydrates dealt with crystallization and identification by physical constants of the single monosaccharides, or derivatives of them. For this purpose large quantities of material were required and the analysis themselves were often tedious and time consuming.

The introduction of partition chromatography as an analytical tool by A. J. P. MARTIN and his coworkers brought about a complete change in this field, as well as in so many other fields of present day analytical chemistry. Small, or even minute amounts of the single monosaccharides could be qualitatively identified or shown to be absent. Quantitative methods soon followed, and one is now justified in stating that the whole field of carbohydrate analysis must be revised in the light of these developments. The possibilities of the new technique must be studied, and ways will be found for separating the individual sugar components in hydrolysates from each other, and for obtaining pure specimens of each. The present author has studied some details of this technique, in connection with the analysis of polysaccharides, in particular the animal mucopolysaccharides.

As a first step a colorimetric method based on the well known reaction between aniline salts and sugars was elaborated (Publication No. I). The reagent aniline trichloroacetate was added directly to the organic phase, usually butanol or mixtures of butanol with lower alcohols, leaving the chromatographic column. This technique permitted the quantitative determination of methylpentoses, pentoses and aldohexoses in amounts between 10 and 300 μg per ml.

Secondly a technique for separating sugars occurring in animal polysaccharides on a starch column was evolved (Publication No. II). It proved possible to separate the components of an artificial mixture containing the seven monosaccharides rhamnose, fucose, ribose, xylose, mannose, glucose and galactose. Amounts of 100—1200 μg of each sugar could be separated and recovered quantitatively.

Accurate qualitative analysis of the single components occurring in polysaccharides and mucopolysaccharides would not have been possible without an automatic fraction collector similar to that constructed by STEIN and MOORE (13) in connection with their work on the separation of amino acids. In collaboration with Civ. Ing. A. CARLANDER the present author therefore modified the automatic fraction collector designed by Stein and Moore, by enclosing the moving inner parts in a case made of glass and stainless steel (Publication No. III). By this means the atmosphere could be kept saturated with the vapour of the solvent used, and concentration of the fractions through evaporation was prevented.

Since present day techniques offer new possibilities for isolating and analyzing the mucopolysaccharides, special attention was paid to this question.

At first a technique of separating different mucopolysaccharides by means of electrophoresis was elaborated. In a joint work with GORDON and ÅQVIST

(Publication No. IV) electrically charged polysaccharides like hyaluronic acid and chondroitin sulphuric acid were separated from each other and from neutral polysaccharides by allowing them to migrate in an electric field in a slab of Hyflo Super-Cel packed on a glass plate. This technique had previously been used by CONSDEN, GORDON and MARTIN (31) for the separation of amino acids and lower peptides, and in this way more or less homogeneous preparations of the acidic mucopolysaccharides suitable for analysis could be obtained. The technique was applied in analyzing the skin mucopolysaccharide of the rat, which could be separated into two fractions containing hyaluronic acid and chondroitin sulphuric acid respectively (Publication No. V).

Attention was then directed to the analysis of the amino sugars glucosamine and galactosamine which occur in mucopolysaccharides and are known to be difficult to identify and almost impossible to separate quantitatively. An attempt was made to identify them by means of the oxidation products, arabinose and lyxose formed when they are treated with ninhydrin (Publication No. VI). The method of crystallizing chondrosamine as its hydrochloride was studied in detail (Publication No. VII). Finally a technique was elaborated for separating the amino sugars on an ion exchange resin, Dowex 50, allowing a complete separation and a quantitative analysis of amounts between 60 and 600 μg of each of the individual amino sugars (Publication No. VIII). The contents of glucosamine and galactosamine in the corneal mucopolysaccharide were determined using this technique.

In a joint work with Drake the amino sugars were traced in the effluent of the column chromatography by means of an automatic recording of the electrolytic conductivity (Publication No. IX).

CHAPTER I

The quantitative determination of monosaccharides dissolved in organic solvents used as the moving phase in partition chromatography

The ordinary reduction methods for the determination of sugars using metal salts are not applicable in organic media. Furthermore heating with strong mineral acids causes discolouration of these solvents so that most of the colorimetric methods are unreliable. Since removal of the organic solvent by evaporation is a tedious procedure when a large number of fractions are to be analyzed simultaneously, there is an urgent need for a method which allows direct quantitative analysis of sugars dissolved in organic solvents leaving the chromatographic column.

The reactions with o-dinitrobenzene or with picric acid proved impracticable. The former showed a high sensitivity but was too labile, the latter was not sufficiently sensitive as it required more than 0.1 mg of substance per ml. A suitable method applicable to alcoholic solutions was finally found in which aniline trichloracetate dissolved in a concentrated solution of trichloroacetic acid was used as the colour producing reagent. PARTRIDGE (1) in his search for spraying reagents suitable for sugars in paper chromatography found aniline salts such

as aniline phthalate quite useful. It gives a reddish colour with aldopentoses, a brown-yellow one with aldohexoses and only a trace of colour with ketohexoses, which, however, react with naphthoresorcinol and trichloroacetic acid. Unlike FORSYTH's phenol-hydrochloric acid reagent (2) which also gives different colours with different groups of sugars, the aniline reagent does not cause any discolouration of the filter paper on drying. HOUGH, JONES and WADMAN (3) in 1950 found p-anisidine and trichloroacetic acid most suitable as a spraying reagent in paper chromatography.

For direct colorimetry in alcoholic solvents the present author found the aniline trichloroacetate reagent more useful. Colour was developed with aldopentoses and aldohexoses but not with fructose. In the case of both pentoses and hexoses, the coloured material exhibited maximum light absorption at 370 m μ . A colour with the same absorption maximum was obtained with furfural also. The colour produced with both types of sugars and with furfural was found to follow Lambert-Beer's law within the range 5–500 μ g/ml.

The applicability of the method over such a wide concentration range made it particularly suitable for direct colorimetry on the effluent in column chromatography, where the concentration in the early and the late fractions of an effluent-concentration curve may differ by a factor of 100 from the concentrations in the peak fractions.

The method was applied to mixtures of butanol and ethanol and of butanol and propanol. High blanks were obtained in ethylene glycol and in ethyl acetate.

A detailed description of the method is given in paper No. I. The accuracy of the method is quite satisfactory as is evident from table 2 in paper I and table 1 in paper II. In the last table the method was applied to the separated fractions in a column chromatography of seven single monosaccharides present in different concentrations.

CHAPTER II

Chromatographic separation and quantitative determination of monosaccharides

Partition chromatography using paper or cellulose as the supporting medium for the aqueous phase was soon introduced for qualitative sugar analysis. After its introduction in this field by PARTRIDGE in 1946 (4) paper chromatography was utilised by a number of authors, e. g. FORSYTH (1948) (2), CHARGAFF, LEVINE and GREEN (1948) (5), PARTRIDGE (1949) (6), JERMYN and ISHERWOOD (1949) (7), ISHERWOOD and JERMYN (1951) (8), TREVELYAN, PROCTER and HARRISON (1950) (9) who used various solvents and various spraying reagents. Attempts were also made by FLOOD, HIRST and JONES (1948) (10) to estimate quantitatively the amount of sugar which could be eluted from filter paper strips after drying the paper at the end of the run. Ordinary micromethods for the determination of sugars were used. HOUGH, JONES and WADMAN (11) separated somewhat larger amounts of sugars as well as methylated sugars on a column of cellulose using butanol-water as the moving phase. The sugars leaving the column were identified by means of paper chromatography and the fractions containing the same sugar were combined. Sufficient material was

thus obtained for crystallization of the compounds. COUNSELL, HOUGH and WADMAN (12) recently separated larger quantities of sugar by performing the chromatographic separation on a cellulose column at an elevated temperature.

In preliminary experiments the present author could not achieve a satisfactory separation of several pairs of sugars on columns of powdered cellulose. It also proved impossible to get constant effluent volumes for the different sugar components. Since STEIN and MOORE (13) convincingly proved that well reproducible chromatograms for amino acids could be obtained on starch columns, similar columns prepared according to their description were tried and found very satisfactory. Such pairs of sugars as ribose and fucose, xylose and ribose as well as glucose and galactose could easily be separated.

The different sugars separated well with *n*-butanol saturated with water or with *n*-butanol : ethanol : water (9 : 1 : 1) as the moving phase. A *n*-butanol : *n*-propanol : water (4 : 1 : 1) mixture was found to be the most convenient solvent. It gave a good separation in a reasonable time and a high extinction coefficient for the sugars in the colorimetric analysis performed directly on the effluent. The details of the technique are given in paper No. II.

On a 20×0.9 cm starch column the seven sugars rhamnose, fucose, ribose, xylose, mannose, glucose and galactose could be separated completely and recovered in amounts between 100 and 1200 μ g. Ketosugars do not react with the aniline reagent.

The chromatography was performed as a liquid chromatogram. The effluent was collected in 0.5 ml fractions in order to utilize the whole resolving power of the column. This arrangement in combination with the slow rate of flow through the column made it necessary to use an automatic fraction collector.

Such a machine was designed operating on the drop counting principle.

The rack carrying the test tubes was placed in a shield of glass and stainless steel in which the atmosphere could be kept saturated with vapour of the same composition as the solvent mixture used.

Changes in the composition of the solvent in the test tubes through evaporation was thereby avoided, a detail which is very essential since the colorimetric method was found to be sensitive to such changes. The photocell was not constantly illuminated as in the apparatus of STEIN and MOORE (13). The light was instead reflected into the photocell at first when a drop passed the light beam. A detailed description of the apparatus is given in paper No. III.

CHAPTER III

On the preparation and analysis of animal mucopolysaccharides

Methods of preparation

As compared with the ease with which protein-free nucleic acids can be obtained, the preparation of protein-free polysaccharides is much more difficult.

Whereas neutral salts like sodium chloride can separate thymonucleic acid from the protein moiety of the organs (HAMMARSTEN 1924 (14)) an extraction with neutral salts yields very little of the mucopolysaccharides (C. TH. MÖRNER 1889 (15), JORPES 1929 (16), BLIX and SNELLMAN 1945 (17)). A good yield of,

for example chondroitin sulphuric acid can be obtained only if the extraction is made with alkali. KRUKENBERG (1884) (18) used 5–10 per cent sodium hydroxide, C. TH. MÖRNER (15) 2–5 per cent potassium hydroxide, JORPES (1929) (16) 2 per cent sodium hydroxide and MEYER and CHAFFEE (1941) (19) 4 per cent sodium hydroxide. There seems to be some kind of linkage between the non denaturated proteins and the mucopolysaccharides, and it does not seem possible to precipitate the proteins or the polysaccharides separately. Even those workers who used protein precipitants like tannic acid (C. TH. MÖRNER 1889 (15)), and phospho-tungstic acid (FÜRTH and BRUNO 1937 (20)) had previously made an alkaline extraction.

The technique developed by SEVAG (1934) (21) which involves denaturation of the proteins by shaking with chloroform and amyl alcohol, a principle which K. A. H. MÖRNER used 1895 (22) for precipitating urinary albumins, has not been quite successful. MASAMUNE and OSAKI (1943) (23) added formalin to block the amino groups in the proteins, which naturally react with the acidic polysaccharides. The proteins were denaturated and precipitated.

Lately several authors have tried to overcome these difficulties by destroying the proteins with proteolytic enzymes. As early as 1891 SCHMIEDEBERG (24) used peptic digestion, but the acid reaction is a disadvantage and the gastric juice itself contains polysaccharides. For this reason CHARLES and SCOTT (1933) (25) used trypsin in preparing heparin, and NEUBERGER (1938) (26) did likewise for the preparation of the polysaccharide in ovalbumin. MASAMUNE and coworkers (1929) (27) also found trypsin digestion very useful.

The fission products can be removed by dialysis and the major part of them remains in solution if the polysaccharides are precipitated with alcohol. This is also the case if the polysaccharides are precipitated with excess glacial acetic acid. HOMAN and LENZ (28) in purifying heparin with phenol-water obtained the proteins in the phenol phase and the heparin in the aqueous phase. The last traces of peptides can be adsorbed on Fuller's earth or similar materials.

The present author has prepared mucopolysaccharides from a number of organs. Proteolytic digestion of the heat denaturated organs by means of glycerol extracts of hog pancreas and hog intestinal mucosa were considered the most suitable method. The method used was essentially as follows.

The organs were frozen and finely ground in a meat chopper, if necessary after addition of carbon-dioxide snow. The frozen mixture was in small portions poured into half its weight of boiling water. After each addition the mixture was brought to boiling before the next portion was added. When the whole amount had been added, it was allowed to boil for 30 minutes, whereby any mucolytic enzymes possibly present in the organs were destroyed. During the boiling a neutral reaction of the mixture should be maintained. The mass was then transferred to a vessel with a tightly fitting lid, and allowed to cool to 40° C. The pH was adjusted to 7.5 with N sodium hydroxide, toluene added in excess to give a surface layer of 0.5 cm thickness, and the vessel shaken thoroughly. Then 5 ml of a glycerol extract of acetone dried pancreas was added per kg of mixture. The glycerol extract was prepared by extracting dry powder of pig's pancreas with 87 per cent glycerol (10 ml pr g of dry powder) at +4° C for four to six hours. The mixture was then diluted with an equal volume of water, and

filtered through a folded filter at $+4^{\circ}\text{C}$. Spontaneous activation of the proenzymes in the pancreas had taken place at room temperature before the treatment with acetone. At the beginning of the digestion performed at 40°C it is necessary to adjust the reaction to pH 7.5 with N sodium hydroxide every four hours. After four or five days the reaction is stabilized. A further 5 ml of pancreatic extract is then added, and the digestion is continued. The degree of digestion is checked through the ratio amino- to total nitrogen.

When further addition of pancreatic extract causes no increase in this ratio, 5 ml of extract of intestine may in some instances still improve the digestion. The intestinal extract was prepared by extracting fresh intestinal pig mucosa with 87 per cent glycerol (10 ml to 1 g of scraping) for five hours at $+4^{\circ}\text{C}$. The mixture was then filtered through a folded filter paper and the filtrate centrifuged. When the addition of intestinal extract no longer improved the ratio, the digestion was interrupted and the mixture evaporated *in vacuo* to a syrup. It was then dialyzed in a cellophane bag against running water for about 10 hours. After another evaporation *in vacuo* it was precipitated with 10 volumes of alcohol, and the precipitate dried with alcohol and ether. The preparation thus obtained usually contained from 10 to 12 per cent of nitrogen and gave distinct carbohydrate reactions.

A preliminary purification can be achieved by repeated precipitation with 10 volumes of alcohol of a weakly alkaline or slightly acidified, 5 per cent, solution of the polysaccharide. The remaining proteins are removed with Lloyd's reagent. A 5 per cent solution in water is acidified with hydrochloric acid to Congo red and any precipitate formed is removed and redigested. An amount of Lloyd's reagent, 3 times the weight of the crude polysaccharide, is added. The reagent should be previously washed with dilute hydrochloric acid in order to remove salts. The adsorbent is removed by centrifuging in a Servall SS-1 centrifuge and 10 volumes of alcohol is added to the solution.

Discussion

If kaolin was used as adsorbent the proteins were not effectively removed. Nor did phenol or glacial acetic acid be effective. In some experiments a column of Dowex 50 proved useful. Thus a polysaccharide containing only 3.5 per cent of nitrogen could be obtained from the digest of the umbilical cord.

The present author throughout applied the principle of breaking down the tissue proteins by means of proteolytic enzymes, and in this way treatment with strong alkali can be avoided. Crystalline trypsin and chymo-trypsin proved to be less effective. Evidently the polypeptidases of the glycerol extract from the pancreas and the intestine are necessary. The question arises, if this principle has any drawbacks. Experience showed that the treatment with the glycerol extracts did not destroy chondroitin sulphuric acid, hyaluronic acid or heparin. The only polysaccharide known to be destroyed is glycogen.

As to the possibility of introducing foreign mucopolysaccharides with a glycerol extract of pancreas and of the intestine the following experiments were made.

2.3 litres of pancreatic glycerol extract was coagulated, concentrated to a small volume, digested according to the method described above, and then dialyzed against running water for 10 hours. An insoluble portion was removed by centrifugation, dried and weighed. Yield, 548 mg. On adding alcohol to the solution a further quantity was obtained which, after drying, weighed 727 mg. The two preparations thus obtained were analyzed for their carbohydrate content according to GURIN and HOOD's (29) modification of Dische's carbazol method. The results are given in Table 1.

Table 1

	Weight mg	Carbohydrate, calculated as glucose	Carbohydrate, cal- culated as glucose per 100 ml of pancreatic extract
Water-insoluble fraction ...	548	3 %	} 2.6 mg
Alcohol precipitate	727	6 %	

The extract from the intestinal mucous membrane may contain more polysaccharides than the pancreatic extract, as the water content in the former is higher.

The content of polysaccharide in the intestinal extract was determined in the same manner as that of the pancreatic extract. 2.3 litres of extract was coagulated and digested after evaporation. 710 mg of substance containing 13.1 per cent carbohydrate calculated as glucose was obtained. This correspond to 4.04 mg of carbohydrate per 100 ml of extract.

The experiments thus showed that extremely small amounts of carbohydrate will be added to the digestion mixture with the glycerol extracts.

For the digestion of the cornea e.g. 150 ml of pancreatic extract had been added, and 6.9 g of polysaccharide was obtained. The amount of polysaccharides obtained from the pancreatic extract was 3.9 mg.

In the digestion of skin (Paper No. V) between 200 and 250 g of acetone dry powder were digested with 15 ml of pancreatic extract and 5 ml of intestinal extract, and the yield was between 250 and 800 mg of polysaccharide. Thus, in this case the amount of carbohydrate obtained from the pancreatic extract was 0.39 mg, and that from the intestinal extract 0.2 mg.

The question whether all the polysaccharides present in an organ are quantitatively extracted by this technique is difficult to answer.

If the digestion is incomplete, part of the carbohydrates will be adsorbed to Lloyd's reagent together with the proteins. Thus a poor yield of a polysaccharide strongly contaminated with protein was obtained in the preliminary experiments with the skin polysaccharide submitted to tryptic digestion only (Paper No. V). When the preparations, 200 to 250 g of skin dry powder in each of 9 experiments, were further digested with intestinal extracts, between 250 and 800 mg of polysaccharide were obtained each time.

From the adsorbing reagent a substance containing 10 to 12 per cent nitrogen, but yielding negligible carbohydrate reactions, can be recovered through extraction with alkali.

Electrophoresis of mucopolysaccharides in a slab of hyflo super-cel

At the time when this investigation was carried out (1949) electrophoresis had not previously been used for separating mucopolysaccharides on a preparative scale. Since hyaluronic acid and chondroitin sulphuric acid were known to have quite different mobilities in an electric field (BLIX (30)) and quantitative separation of them by means of precipitation methods can hardly be affected, an attempt was made to separate the two polysaccharides from each other and from the neutral polysaccharides by means of electrophoresis (Publication No. IV).

This technique had been applied successfully by CONSDEN, GORDON and MARTIN (31) for the separation of amino acids and peptides. These authors used a slab of silica jelly as stabilizing agent. After some less successful attempts to use quartz powder in the apparatus of CONSDEN *et al.* the present authors found a mass of Hyflo Super-Cel saturated with a suitable buffer very convenient. The packing of the slab on the glass plate must be carried out with the utmost care in order to get the correct consistency (See paper No. IV). The slab of Super-Cel retained its consistency practically unchanged during the whole run.

The polysaccharide mixture to be subjected to electrophoresis, usually some 30–40 mg. is dissolved in buffer and made into a thick paste with Super-Cel. The paste is then packed carefully into a groove, 1 cm wide, cut out from the slab parallel to the electrodes. A drop of fuchsin solution was used as indicator, and a fast moving fraction of this indicated when a run could be cut. At the end of the run strips of the Super-Cel were cut out parallel to the electrodes, and the polysaccharides present were eluted with water.

In experiments where 20 mg amounts of hyaluronic acid and chondroitin sulphuric acid were added the recovery of the separated components was 80–90 per cent.

Paper IV reports an experiment in which 200 mg of an almost protein-free preparation of a hog skin polysaccharide was submitted to electrophoresis. Complete separation of hyaluronic acid and chondroitin sulphuric acid was achieved.

In paper V, BOSTRÖM and the present author reported the separation of the mucopolysaccharides of rat skin into two fractions, the faster moving of which corresponded to chondroitin sulphuric acid.

Recently the present author has treated the ox corneal polysaccharide and the polysaccharide from the human intervertebral discs and the nucleus pulposus in a similar way.

The technique of separating the polysaccharides into fractions in accordance with their ability to migrate in an electric field will evidently become an integral part of carbohydrate analysis in the future, at least when dealing with mucopolysaccharides.

The identification and quantitative determination of the amino sugars occurring in mucopolysaccharides

After P. A. LEVENE'S (32) fundamental work on the structure of the amino-hexoses occurring in animal mucopolysaccharides, which demonstrated that the amino sugar of chondroitin sulphuric acid is galactosamine, the occurrence of

this amino sugar and of glucosamine in various polysaccharides in the animal organs has been the subject of much discussion.

ELSON and MORGAN's colorimetric method (33) and modifications thereof for the quantitative determination of hexosamines (34, 35, 36, 37, 38) have been of utmost importance for the determination of the total amount of amino sugars.

The ZUCKERKANDL (39) reaction applied in this method gives the same colour with both the common hexosamines, and the methods due to DISCHE (40) and to TRACEY (41) also do not differentiate glucosamine from galactosamine. Since the preparation of pure specimens of both the amino sugars is very difficult, at least when they occur together, our knowledge of the partition of the two amino sugars in the natural animal mucopolysaccharides is very meager. One of the main reasons is that the hydrochloride of galactosamine is very readily soluble. There is a real demand for methods of analyzing these sugars quantitatively in animal organs.

In paper VI the present author in cooperation with HELJKENSKJÖLD and ROCH-NORLUND described an attempt to identify glucosamine and galactosamine through their oxidation products, arabinose and lyxose, formed on treatment with ninhydrin. The two pentoses could easily be separated and identified by means of paper chromatography.

Special attention was also paid to the technique of crystallizing chondrosamine from hydrolysates of chondroitin sulphuric acid originally elaborated by LEVENE (32). Details of the technique were given in paper VII. The yield of galactosamine hydrochloride was about 60 per cent of the theoretical.

It is evident that the chromatographic technique offers new possibilities for separating these two compounds. The first attempt to separate them by means of paper chromatography was made by AMINOFF and MORGAN (42) and by PARTRIDGE (6) in 1948. These authors used collidine-water or phenol-water as the moving phase but both hexosamines, however, migrated at about the same speed, and the spots showed considerable tailing.

MORGAN *et al.* (43) showed that qualitative identification of the compounds is possible if their N-dinitrophenyl derivatives are chromatographed on a celite column with a borate buffer as the stationary phase and amyl alcohol as the moving one.

Chromatographic separation of amino sugars on Dowex 50

As the basic amino sugars are well suited for chromatography on ion exchange resin the present author elaborated a method for separating them in this way. MOORE and STEIN (44) and PARTRIDGE (45) in their work with amino acids showed that glucosamine as well migrates on suitable resins, Dowex 50 and Zeo-Karb 215. As described in paper VIII, the hydrochlorides of glucosamine and galactosamine can easily be separated on a column of Dowex 50 using 0.3 N HCl as solvent. Amounts up to 50 mg of each of the hydrochlorides, sufficient for identification by means of optical rotation, were separated on a column 4×40 cm. The method was also worked out for quantitative analysis of small amounts (60–600 μ g) of hydrochloride on a column 0.7×40 cm. The effluent was collected in the automatic fraction collector in 0.5 ml fractions which were analyzed by the Elson-Morgan method as modified by BLIX (37). A slight

modification of Blix's technique was introduced and described in the original paper (No. VIII) whereby the alkalinity during the boiling reached about pH 9.6, the pH which according to SØRENSEN (38) is optimal for the colour development.

Application of the method to the analysis of mucopolysaccharides

MORGAN *et al.* (46) made the most interesting statement that both glucosamine and galactosamine occur in the blood group-A substance isolated from the pseudomucin from ovarian cysts. Similarly WOODIN (47) recently found both amino sugars to be present in the corneal mucopolysaccharide.

The present author therefore analyzed the beef corneal mucopolysaccharide, a protein-free fraction containing 3.6 cent sulphur, as ester sulphates (calculated on air-dried substance) for the various hexosamines, with the results shown in Table 2. (Table III in paper No. VIII.)

Table 2

Time of hydrolysis Hours	Percentage of amino sugar expressed as hydrochloride				
	Component				Total
	I	II	III (glucosamine)	IV (galactosamine)	
2	2.0	1.8	13.7	7.9	25.4
8	1.4	—	14.9	9.6	25.9
24	Trace	—	15.1	9.4	24.5

As is evident from the table, two fast moving small fractions (components I and II) of incompletely hydrolysed oligosaccharides giving the Elson-Morgan reaction can be traced at the beginning of hydrolysis. They disappear after twenty-four hours with a simultaneous increase in the amount of the free amino sugars.

The technique of separating and analyzing the two amino sugars was applied to the two fractions obtained by BOSTRÖM and the present author by electrophoresis of rat skin polysaccharide (paper No. V). The slow moving fraction with hyaluronic acid contained 10.4 per cent of glucosamine-HCl and a trace of galactosamine. The fast moving chondroitin sulphuric acid contained 19.8 per cent of galactosamine-HCl.

Analysis of the effluent by means of electrolytic conductivity

In the original method the effluent was collected in fractions and the content of amino sugars determined colorimetrically. It was found, however, that the method of DRAKE (48) in which the substances are analyzed by means of continuous recording of the electrolytic conductivity of the effluent, was suitable for the analysis of mixtures of amino sugars. The separation was carried out as usual on a column of Dowex 50 and the effluent was allowed to pass through

a conductivity cell. The conductivity was recorded and the amount of substance computed as described by DRAKE (48).

An analysis of the 8 hour-sample in Table 2 showed a good agreement with the result found with the colorimetric method. Details are given in paper No. IX.

The Chemistry Department II, Karolinska Institutet, Stockholm (Sweden).

REFERENCES

1. PARTRIDGE, S. M., *Nature* **164**, 443 (1949).
2. FORSYTH, W. G. C., *Nature* **161**, 239 (1948).
3. HOUGH, L., JONES, J. K. N., and WADMAN, W. H., *J. Chem. Soc.* 1702 (1950).
4. PARTRIDGE, S. M., *Nature* **158**, 270 (1946).
5. CHARGAFF, E., LEVINE, C., and GREEN, C., *J. Biol. Chem.* **175**, 67 (1948).
6. PARTRIDGE, S. M., *Biochem. J.* **42**, 238 (1948).
7. JERMYN, M. A., and ISHERWOOD, F. A., *Biochem. J.* **44**, 402 (1949).
8. ISHERWOOD, F. A., and JERMYN, M. A., *Biochem. J.* **48**, 515 (1951).
9. TREVELYAN, W. E., PROCTER, D. P., and HARRISON, J. S., *Nature* **166**, 444 (1950).
10. FLOOD, A. E., HIRST, E. L., and JONES, J. K. N., *J. Chem. Soc.* 1679 (1948).
11. HOUGH, L., JONES, J. K. N., and WADMAN, W. H., *Nature* **162**, 448 (1948).
12. COUNSELL, J. N., HOUGH, L., and WADMAN, W. H., *Research* **4**, 143 (1951).
13. STEIN, W. H., and MOORE, S., *J. Biol. Chem.* **176**, 337 (1948).
14. HAMMARSTEN, E., *Biochem. Z.* **144**, 383 (1924).
15. MÖRNER, C. TH., *Skand. Arch. Physiol.* **1**, 210 (1889).
16. JORPES, E., *Biochem. Z.* **204**, 354 (1929).
17. BLIX, G., and SNELLMAN, O., *Arkiv Kemi, Mineral. Geol.* **19 A** No. 32 (1945).
18. KRUKENBERG, C. FR. W., *Zeitschr. f. Biol.* **20**, 307 (1884).
19. MEYER, K., and CHAFFEE, E., *J. Biol. Chem.* **138**, 491 (1941).
20. FÜRTH, O., and BRUNO, T., *Biochem. Z.* **294**, 153 (1937).
21. SEVAG, M. G., *Biochem. Z.* **273**, 419 (1934).
22. MÖRNER, K. A. H., *Skand. Arch. Physiol.* **6**, 332 (1895).
23. MASAMUNE, H., and OSAKI, S.-I., *Tohoku J. Exp. Med.* **45**, 121 (1943).
24. SCHMIEDEBERG, O., *Arch. exp. Path. Pharmacol.* **28**, 355 (1891).
25. CHARLES, A. F., and SCOTT, D. A., *J. Biol. Chem.* **102**, 425 (1933).
26. NEUBERGER, A., *Biochem. J.* **32**, 1435 (1938).
27. MASAMUNE, H., *Tohoku J. Exp. Med.* **50**, 107 (1949).
28. HOMAN, J. D., and LENZ, J., *Biochim. et Biophys. Acta* **2**, 333 (1948).
29. GURIN, S., and HOOD, D. B., *J. Biol. Chem.* **131**, 211 (1939).
30. BLIX, G., *Acta Physiol. Scand.* **1**, 29 (1940—41).
31. CONSDEN, R., GORDON, A. H., and MARTIN, A. J. P., *Biochem. J.* **40**, 33 (1946).
32. LEVENE, P. A., *Hexosamines and Mucoproteins*, London (1925).
33. ELSON, L. A., and MORGAN, W. T. J., *Biochem. J.* **27**, 1824 (1933).
34. BOYER, R., and FÜRTH, O., *Biochem. Z.* **282**, 242 (1935).
35. NILSSON, I., *Biochem. Z.* **285**, 386 (1936).
36. PALMER, J. W., SMYTH, E. M., and MEYER, K., *J. Biol. Chem.* **119**, 491 (1937).
37. BLIX, G., *Acta Chem. Scand.* **2**, 467 (1948).
38. SØRENSEN, M., *Compt. rend. trav. Lab. Carlsberg, Sér. Chim.* **22**, 487 (1938).
39. ZUCKERKANDL, F., and MESSINER-KLEBERMASS, L., *Biochem. Z.* **236**, 19 (1931).
40. DISCHE, Z., and BORENFREUND, E., *J. Biol. Chem.* **184**, 517 (1950).
41. TRACEY, M. V., *Biochem. J. Proc. of Biochem. Soc.* **49**, xx (1951).
42. AMINOFF, D., and MORGAN, W. T. J., *Nature* **162**, 579 (1948).
43. ANNISON, E. F., JAMES, A. T., and MORGAN, W. T. J., *Biochem. J.* **48**, 477 (1951).
44. MOORE, S., and STEIN, W. H., *J. Biol. Chem.* **192**, 663 (1951).
45. PARTRIDGE, S. M., *Biochem. J.* **45**, 459 (1949).
46. AMINOFF, D., MORGAN, W. T. J., and WATKINS, W. M., *Biochem. J.* **46**, 426 (1950).
47. WOODIN, A. M., *Biochem. J.* **51**, 319 (1952).
48. DRAKE, B., *Arkiv Kemi* **4**, nr 29, 401 (1952).

Tryckt den 22 augusti 1952

Uppsala 1952. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

An automatic fraction collector¹

By AXEL TH. CARLANDER and SVEN GARDELL

With 5 figures in the text

Partition chromatography with starch as the supporting medium, or chromatography using ion exchange resins in a finely divided form in which the rate of flow is low, requires an automatic fraction collector of some sort for its practical application. For quantitative analytical purposes, the fraction collector may of course be replaced by an apparatus which automatically determines the concentration of the separated substances and the volume of the effluent.

A number of fraction collectors have been described. In the main they are designed according to the following principles:

1. The time principle. In this machine the tube in which the effluent is collected is replaced at given intervals.
2. The weight principle. Here a tube is replaced when it has collected a given weight of the effluent.
3. The "siphon" principle. Here a vessel of a given capacity is filled and empties itself into a test tube which is then replaced.
4. The drop-counting principle. A given number of drops is counted into a test tube which is then replaced.

Combinations of the mentioned principles are also used.

The first principle is widely used and the simplest machines operate on a time basis (EDMAN 1948 (1)). As the rate of flow through a column, however, is seldom constant, these machines are not suitable for collecting fractions of equal volume. The second method may be used with advantage for this purpose, and the accuracy with which the fractions are collected depends on the accuracy with which the balance is set. In these machines, however, the tubes or receivers must be of equal weight. The third principle certainly delivers fractions of equal volume, but it is not suitable for small fractions.

The drop counters collect fractions of equal volume, and the accuracy with which this is achieved depends on the variation in drop size. An excellent machine for collecting fractions according to the drop-counting principle has been constructed by STEIN and MOORE (2). In this machine the drops are counted when they interrupt a beam of light focussed on a photocell. The interruption of the light beam causes an impulse from the photocell to be registered in a counter. The machine has certain drawbacks, one being that the photocell is illuminated all the time. Hereby the photocell is exhausted and its sensitivity and stability

¹ The fraction collector is manufactured by Svenska Mätapparater, F. A. B., Stockholm, Sweden.

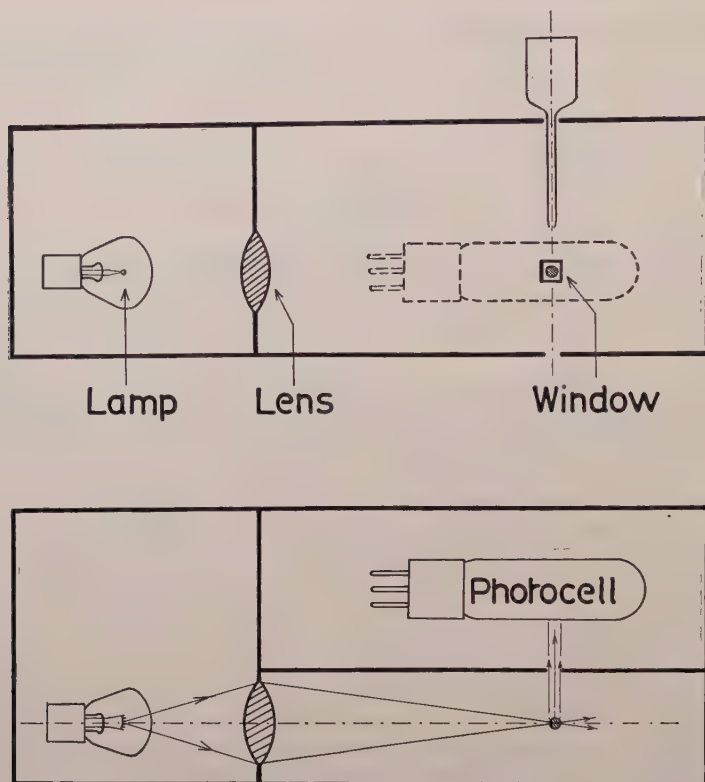


Fig. 1. Principle of the Photoelectric Transducer.

are reduced. For continuous work, therefore, the sensitivity is to be adjusted at regular intervals.

In the machine described below these drawbacks have been eliminated as far as possible.

General layout

The apparatus consists of two units, the amplifier and the collector unit. The units are connected by a cable.

The amplifier unit contains all the electric controls. The collector unit contains the photoelectric transducer, the drive motor with limit switches, and some relays which have been located here because they may produce disturbing impulses.

Electrical layout

1. The photoelectric transducer

As the drop falls, it passes through a beam of light sharply focussed on the path of the falling drops. Part of the light will then be deviated by the drop so as to fall on a photocell producing an electric impulse. The arrangement is outlined in Fig. 1. Because light reaches the photocell only when a drop falls,

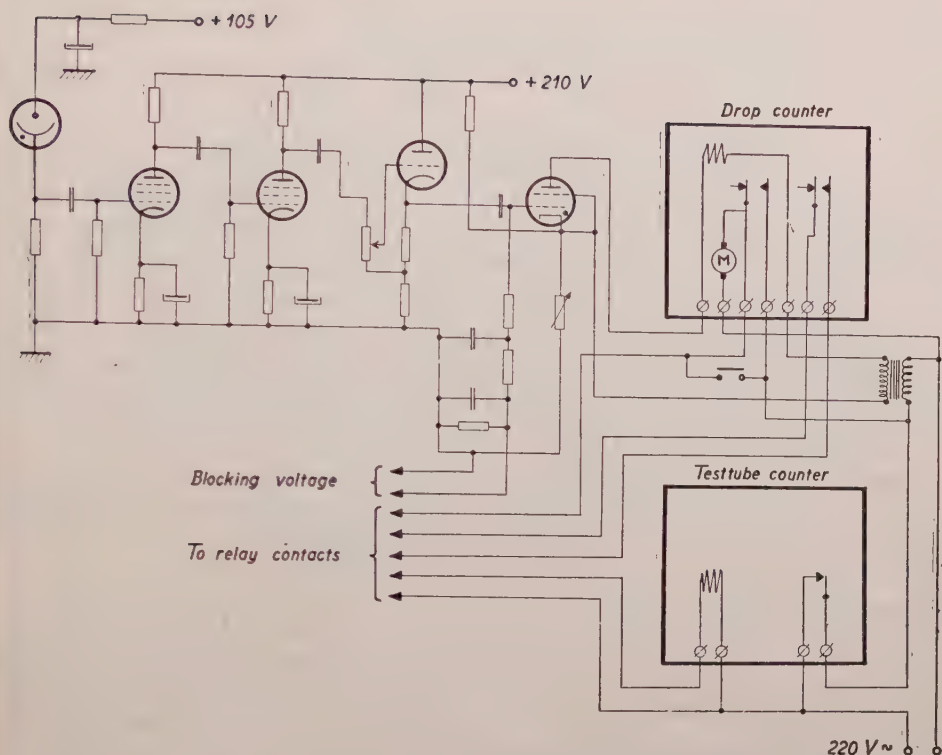


Fig. 2. Simplified Circuit Diagram of the Amplifier and the Counters.

there will be no exhaustion of the cell. Another important advantage of the method is that variations in the intensity of the lamp will never be critical.

The lamp used is a tone film lamp with a spiralised filament. To obtain a suitable colour with regard to the sensitivity of the photocell, the lamp is fed with an approximately normal voltage. It has been found advisable to have the lamp exchanged after about 300 hours.

To facilitate the adjustment of the lamp after exchange, the lamp holder is mounted on a device consisting of three slides at right angles to each other and individually adjustable by means of handwheels.

The photocell used is of the gas-filled type.

2. The amplifier

The impulses produced by the photocell have to be amplified before they can be registered by an electro-mechanical counter. The amplifier has two straight stages and a cathode follower. The cathode follower is followed by a thyatron, the anode circuit of which includes the drop counter.

All supply voltages are well stabilized, and critical cables are carefully screened.

During exchange of test tubes, disturbing impulses sometimes are introduced in the amplifier. To prevent registration of these impulses, a blocking voltage

is connected to the thyatron during the exchange operation. A resistor-condenser-filter levels the front of the blocking voltage.

The amplifier with photocell and drop counter is shown in principle by Fig. 2.

3. The drop counter

The drop counter is of a special design. First of all, the counter registers every incoming impulse in the usual manner. Further, it must be readily adjustable in such a manner that an electric circuit will be closed or broken after a predetermined number of registered impulses, with simultaneous resetting of the counter.

The counter is of the 5-place type (5 main wheels), and can thus register up to 99.999 impulses. To each main figure wheel is coupled a contact wheel with figures; these contact wheels can be released by pressing a button, so that they may be turned by hand to the desired figure. The incoming impulses are added on the main figure wheels, and at the same time a subtraction is made on the contact wheels.

Resetting of the counter is done by a small motor which automatically engages when the pre-set number of impulses is reached. When necessary, the counter may also be reset to zero by a button on the front panel.

The wiring diagram of the counter is also shown in Fig. 2.

4. The test tube counter

The device counting the number of test tubes is similar in design to the drop counter, but has no automatic resetting facilities. The test tube counter is connected with a switch which breaks the current of the whole apparatus when the pre-set number of filled test tubes has been reached. Resetting of the counter is done by hand by pressing a button.

Mechanical layout

A. The amplifier unit

The amplifier and the counters with supply attachment for 220 volts 50 c.p.s. are built on a sturdy iron chassis with a panel of heavy aluminium. The unit is placed in an oak cabinet the inside of which is covered with sheet copper for efficient screening against external disturbances. The necessary circulation of air is secured through metal grids.

B. The collector unit

The collector unit is built on a chassis of acid resistant sheet steel and all external details are either made of stainless steel or of heavy chrome-plated brass. The side windows are made of glass with rubber packings. All parts protruding through the chassis are provided with collars, to prevent any fluid, in case of flooding, from reaching the parts placed under the chassis.

1. The test tube rack

The circular rack carrying the test tubes is also made of acid resistant sheet steel and consists of a 2 mm bottom disc and of two 1.5 mm discs with holes for a total of 240 test tubes. The holes are arranged in four concentric circles with 60 in each circle. The rack has a diameter of about 800 mm.

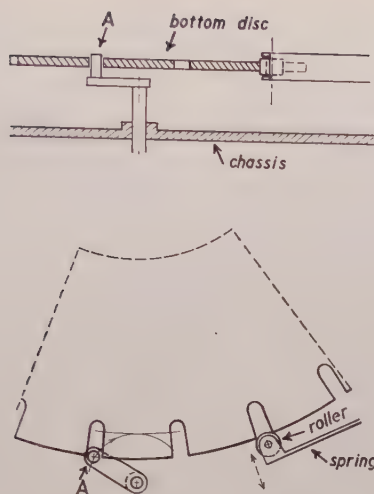


Fig. 3. Principle of the Movement Mechanism.

The rack revolves round a stationary vertical shaft attached to a frame system under the chassis. The shaft is supported by a two-piece axial ball bearing which permits lifting of the rack for easy inspection and cleaning.

2. The movement mechanism

The bottom disc of the test tube rack has 60 radial slots in which a motor-operated arm can move the disc forward step by step. The same principle was applied by STEIN and MOORE (2).

Various principles for the movement mechanism were discussed, but the one described here proved to be the simplest, and was found to be very reliable in operation. Moreover, it is the only one which starts and stops the rack gently, eliminating violent shocks to the tubes.

The starting position of the arm (A) is shown in Fig. 3. When the switch of the drop counter closes, the motor current is switched on by an impulse-operated step relay. The arm then turns the rack at an accelerating speed. Before leaving the slot, the arm again (for geometrical reasons) reduces the angular velocity to zero. In this position, or immediately before, an auxiliary arm under the chassis (not visible in the figure) acts on a micro-switch which makes the step relay break the motor current. An electromagnetic brake limits the movement of the arm to the next starting position. To accentuate the starting position, a spring-loaded pulley runs along the openings of the slots. This also facilitates the correct setting of the rack when turned by hand, e. g. for putting in or taking out test tubes.

3. The column holder

The column is mounted on a pivoted holder attached to one corner of the chassis. The holder is robustly built and attached to the framework under the chassis. It also supports the transducer previously described.

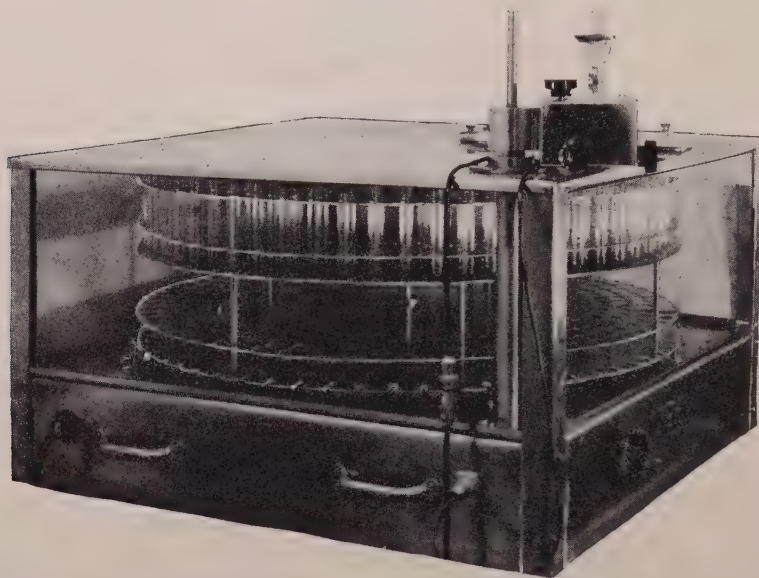


Fig. 4. View of the collector showing a test tube double rack and the photoelectric transducer.

As already mentioned, the test tubes are placed in four concentric circles in the rack. To fill all the circles, the column holder must therefore be able to switch from one circle to another. This is also the case with the described apparatus. The device used for this purpose is purely mechanical. A radial arm on the vertical shaft is spring-loaded in one direction. The arm rests between a number of pins on a cradle. When the cradle is tilted, which is done manually from outside by a handwheel, or by a stationary neck on the bottom disc of the rack, the spring will pull the arm forward to another pin. This shifting arrangement has proved quite satisfactory. Shocks are eliminated by an oil damper.

The arm can also be revolved so that the column can drop inside the inner ring of test tubes. This position is used for adjusting the drop speed, etc.

4. The housing

To prevent evaporation from the test tubes, the rack is completely enclosed. The walls of the housing are made of glass, so that rack and test tubes are easily inspected from outside. The roof is made of stainless steel, with an opening covered by a removable glass plate through which test tubes are put in or removed. The housing is perfectly tight; a saturated atmosphere is produced by an open bowl of solvent placed inside. Thorough tests have shown that no evaporation from the test tubes will occur.

Adjusting the apparatus

The column is mounted in its holder, so that its lower part rests against the drop funnel on the transducer (see Fig. 1). The tip of the drop funnel is placed



Fig. 5. View of the amplifier with the counters.

just above the window of the photocell. The solvent is made to flow drop-wise from the funnel, and the lamp is adjusted by means of the handwheels in such a manner that the light is focussed on the spot where the drop passes the photocell window. This is easily observed through a small window in front of the photocell. The size of the impulses from the phototube is determined by the size of the drops and to a certain extent by the optical qualities of the solvent. The size of the drops may be determined, within certain limits, by the shape of the funnel tip.

When changing the drop size, or in changing over from one solvent to another, the adjustment of the amplifier should be checked. A sensitivity control is located on the amplifier panel. It should not be set to a higher degree of sensitivity than necessary, because the level of disturbances is raised accordingly. Test work with large drops and a high degree of amplification may be disturbed by impulses from vibration of the drop surface before the drop has left the funnel. These vibrations may be produced by external mechanical shocks on the apparatus. When the drops are small, the risk of disturbance is considerably reduced.

REFERENCES.

1. EDMAN, P., *Acta Chem. Scand.* 2, 592 (1948).
2. STEIN, W. H., and MOORE, S., *J. Biol. Chem.* 176, 337 (1948).

The Laboratories of the Svenska Mätapparater F. A. B. and the Chemistry Department II, Karolinska institutet, Stockholm (Sweden).

Tryckt den 22 augusti 1952

Uppsala 1952. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

Chromatography combined with automatic recording of electrolytic conductivity

II. The analysis of a mixture of glucosamine and galactosamine

By BIRGER DRAKE and SVEN GARDELL

With 2 figures in the text

When comparing the preparative and analytical methods of one of us (S. G.) (1) with the methods and apparatus of the other (B. D.) (2), it was considered worth while trying a combination.

Because of lack of time and other factors outside the control of the authors, only the experiments described here could be performed now. It is hoped, however, that it will be possible in the future to extend the work to many more determinations and to a closer study of the possibilities of the analytical method.

Preparations

Glucosamine hydrochloride was prepared from shells of lobsters and recrystallized three times from an aqueous solution. $[\alpha]_D^{20} = +71.8$ in equilibrium (2 per cent aqueous solution). Accepted values $+72.5$.

Galactosamine was prepared according to the directions given by GARDELL (3) and recrystallized three times from methanol and dilute hydrochloric acid with the aid of acetone. $[\alpha]_D^{20} = +96.4$ in equilibrium (2 per cent aqueous solution). LEVENE found $+96.4$.

The hydrolysate analyzed had been prepared from a polysaccharide fraction from beef cornea.

114.5 mg of the polysaccharide was hydrolysed with 5 ml of 6 N hydrochloric acid. 1 ml samples were pipetted off after 2, 8, and 24 hours of hydrolysis. The samples were evaporated to dryness *in vacuo* over sodium hydroxide and finally taken up in 3 ml of 0.3 N hydrochloric acid.

The same hydrolysate was used in a previous publication (1) (Table 3, the 8 hour sample).

Analytical determinations

The chromatographic set-up was the following: In a tapered glass tube with inner diameter 4 mm., Dowex 50 (400–500 mesh) was packed as a slurry to

Table 1

Experimental data for runs with known solutions of glucosamine-HCl (Glu) and galactosamine-HCl (Gal). Estimation of k_B values

Run No.	Substance	% w/v	ml intro-duced	mg intro-duced	k_t ml/hour	$\int \Delta R dt$ cm ²	$100 \cdot k_B$
1	Glu	1.065	0.095	1.01	2.03	27.3	1.82
2	Gal	0.29	0.285	0.827	1.86	20.5	(1.41) ¹
3	Glu	1.065	0.095	1.01	1.33	41.3	1.84
	Gal	0.29	0.190	0.551		22.8	1.82
4	Glu	1.065	0.070	0.746	1.16	37.8	1.70
	Gal	0.29	0.285	0.827		39.6	1.80

¹ Run No. 2 was unsuccessful, and the k_B value obtained should not be used.

Table 2

Analysis of a mixture of glucosamine and galactosamine in the hydrolysate of a polysaccharide fraction from beef cornea

Run No.	ml intro-duced	Component	k_t ml/hour	$100 \cdot k_B$	$\int \Delta R dt$ cm ²	mg calcu-lated
5	0.38	X	1.45	(1.8?)	(15)	(0.40)
		Y		(1.8?)	(1)	(0.03)
		Glu		1.79	18.3	0.475
		Gal		1.81	10.3	0.270
6	0.76	X	1.43	(1.8?)	(27)	(0.70)
		Y		(1.8?)	(1)	(0.03)
		Glu		1.79	37.3	0.955
		Gal		1.81	22.2	0.575

about 40 cm height. The column was washed with 0.25 N HCl until the conductivity recorder indicated that the acid solution passed the filter without change in concentration. All the runs were performed with 0.25 N HCl as a solvent. With this chromatographic system, the top of the peak of glucosamine will appear at about 21 ml and that of galactosamine at about 25 ml. These retentions are much smaller than that of aspartic acid which is the fastest moving of the natural amino acids.

The apparatus used was similar to that described earlier (2), the only divergence being that the electronic adapter had a new design, which will be described in due course (4). The actual records, however, have the same appearance as with the older apparatus. In the runs described here, the setting of the decade resistance in the compensating arm of the bridge was usually 4950 ohms, and the series potentiometer had the resistance 100 ohms. Thus, that chart width corresponded to 2 per cent of the total resistance.

Table 3

Comparison of values of hexosamine content in a polysaccharide, obtained by conductometry (cond.) and by colorimetry (color.)

Method of analysis	Run No.	Percentage of glucosamine-HCl	Percentage of galactosamine-HCl	Quotient:
				$\frac{\text{mg Glu} \cdot 100}{\text{mg Glu} + \text{mg Gal}}$
Cond.	5	16.3	9.3	63.7
Cond.	6	16.4	9.9	62.4
Color.	(S. G.) (1)	14.9	9.6	60.8

Table 1 is used for the estimation of k_B values according to the formula $M = k_i \cdot k_B \int \Delta R \cdot dt$ (cf.², formula 2), where M is measured in milligrams and ΔR is the difference between the recorded curve and the intrapolated base line. Table 2 is used for the estimation of the two hexosamines in the hydrolysate, using the mean values of k 1.79 for glucosamine and 1.81 for galactosamine. Two other peaks, which were also recorded in these runs, have been included in the same table, and their approximative amounts have been calculated, using the k_B value 1.8. These peaks do not appear when pure glucosamine-HCl and galactosamine-HCl are chromatographed. Table 3 gives a comparison of the data for the contents of the two hexosamines in the polysaccharide investigated, including those obtained from the values in the last column of Table 2 and those obtained by colorimetry. The values for galactosamine are the same with both methods, while for glucosamine the conductometric method gives higher values than the colorimetric method.

Fig. 1 gives a photographic reproduction of the relevant part of the record of run no. 5.

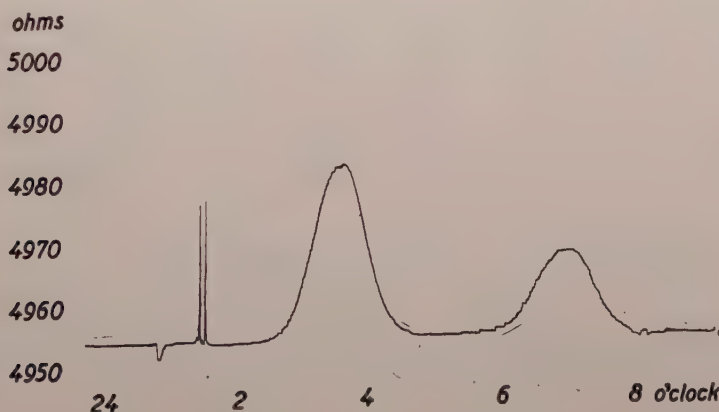


Fig. 1. Photographic Reproduction of the Relevant Part of the Recording from Run no. 5. Before the two hexosamine peaks there is one small artifact and the recordings of two incidental air bubbles.

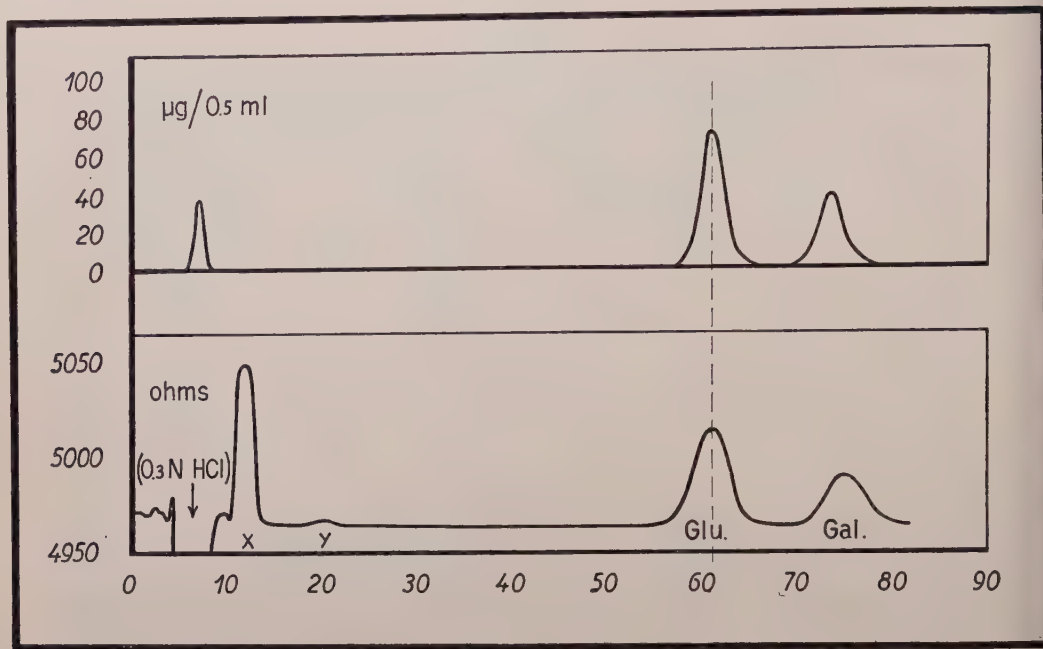


Fig. 2. Comparison of two Analyses of the Hydrolysate. Lower part: a similar analysis (run no. 6) with automatic recording of the electrolytic conductivity in the eluate. Upper part: chromatography with colorimetric determinations (1).

Fig. 2, upper part, shows a curve obtained for the hydrolysate by chromatography combined with a colorimetric procedure (1), while Fig. 2, lower part, shows a conductivity record of a similar analysis. In both cases Dowex 50 was used, but not of the same batch. Also, the column sizes and the HCl concentrations were not the same in the two experiments. However, the differences were not great, and the lower curve has been recalculated to another volume scale to obtain coincidence of the two glucosamine peaks (61.2 ml in GARDELL's experiment (1)). The deep depression of the conductivity base line soon after the start is caused by the fact that the sample was dissolved in approximately 0.3 N HCl, whereas the runs were performed with 0.25 N HCl.

The peak "X" may contain the same substance as the first peak in the colorimetric curve, but a closer investigation of this question could not be undertaken now.

Institute of Biochemistry, University of Uppsala, Uppsala.

The Chemistry Department II, Karolinska Institutet, Stockholm (Sweden).

REFERENCES: 1. Gardell, S.: *Acta Chem. Scand.* 7, 207 (1953). — 2. Drake, B.: *Arkiv Kemi* 4, nr 29, 401 (1952). — 3. Gardell, S.: *Acta Chem. Scand.* 5, 195 (1951). — 4. Drake, B.: To be published.

Tryckt den 22 augusti 1952

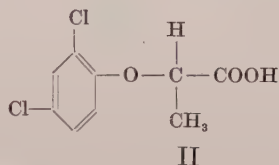
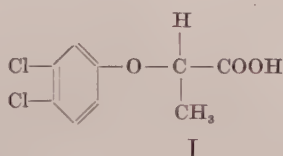
Uppsala 1952. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

Stereochemical studies on plant growth regulators. I.

Optically active α -(3,4-dichlorophenoxy)-propionic acid and
 α -(2,4-dichlorophenoxy)-propionic acid.

By MAGNUS MATELL

As part of a more extensive investigation on stereochemical specificity of synthetic growth substances the author has resolved into optical antipodes α -(3,4-dichlorophenoxy)-propionic acid (I) and α -(2,4-dichlorophenoxy)-propionic acid (II).



As far as the author could find neither the antipodes nor the racemic form of the acid I have been described in the literature earlier. The racemic form of II is well-known and the biological activity of the (+)-form has been studied by THIMANN (1) but no informations on the resolution of the racemic acid or the properties of the antipode could be found in the literature.

Preliminary measurements by Dr. BÖRJE ÅBERG have shown, that the (+)-form of I is about 100 times more effective in root inhibition than the (-)-form, and that the (+)-form of II is about 500 times more effective than the (-)-form in the same respect (private communication).

In a previous paper it was pointed out that the configurational relations are of great interest for the understanding of the influence of sterical factors on biological activity (2). No *definite* conclusions on steric relations can be drawn from a comparison of the rotatory powers in different solvents. It is, however, possible in some cases to establish such relations with some probability by this method. In table 1 the specific rotations in different solvents are tabulated for (-)- α -(1-naphthoxy)-propionic acid and the (+)-forms of the acids under investigation. As seen from table 1 the three compounds all give decreasing series of the rotatory powers and this indicates that they have the same configuration.

To avoid mistakes owing to the change in direction of rotation for the 2,4-dichloro-substituted acid the form which is *dextrorotating in alcohol* will be referred to as *dextrorotatory* or (+)-acid.

Table 1

$[\alpha]_D$ for $(-)\alpha$ -(1-naphthoxy)-propionic acid (1-NOP), $(+)\alpha$ -(3,4-dichlorophenoxy)-propionic acid (I) and $(+)\alpha$ -(2,4-dichlorophenoxy)-propionic acid (II) in different solvents.

Solvent	1-NOP $[\alpha]_D^{20}$	I $[\alpha]_D^{25}$	II $[\alpha]_D^{25}$
Acetone	-47.2°	+54.8°	+35.2°
Alcohol (abs.)	-49.6°	+39.1°	+28.1°
Chloroform	-58.8°	+23.9°	+21.0°
Water (Na-salt)	-94.6°	+14.6°	-14.1°
Benzene	-149.6°	+3.5°	-17.1°

For further informations concerning the steric relationships the method of quasi-racemates (3) was preliminarily applied by means of the contact method of KOFER (4) as this combination of methods has been shown to be extremely suitable for problems of this type (5). The thermal data for some binary systems are collected in table 2. The acids I and II both give molecular compounds with α -(2-naphthoxy)-propionic acid with opposite direction of rotation while acids with the same sign of rotation give simple eutectic systems or solid solutions. Consequently the molecular compounds probably are quasi-racemic and then the α -(2-naphthoxy)-propionic acid and the compounds I and II with the same direction of optical rotation also have the same configuration. This is in good agreement with the results from the optical activity measurements, as in a previous work it was shown that the isomeric 1- and 2-naphthoxy- α -propionic acids with the same direction of rotation have opposite configurations (2). The steric relations between the optically active forms of I and II will be more closely investigated later.

It may thus be pointed out that there is evidence for the assumption that optically active aryloxy-alkylcarboxylic acids with similar growth regulating properties belong to the same steric series. In order to verify this, work on similar plant growth substances is in progress at this institute.

Table 2

Thermal data obtained by the contact method.

α -(3,4-Dichlorophenoxy)-propionic acid (I), α -(2,4-dichlorophenoxy)-propionic acid (II) and α -(2-naphthoxy)-propionic acid (2-NOP).

Component 1	M.p.	Component 2	M.p.	Eutectic or min. temp.	Molecular com- pound M.p.
(+)-I	121°	(+)-2-NOP	119°	88°	—
(-)-I	121°	(+)-2-NOP	119°	91°/93°	95°
(+)-II	123°	(+)-2-NOP	119°	105.5°	—
(-)-II	123°	(+)-2-NOP	119°	96°/95°	99°

Experimental

rac.- α -(3,4-Dichlorophenoxy)-propionic acid. (I). 1.73 g (0.075 mole) sodium were dissolved in 40 ml abs. alcohol, 12.2 g (0.075 mole) 3,4-dichlorophenol and 13.6 g (0.075 mole) ethyl α -bromopropionate were added and the solution refluxed for two hours. 60 ml 2-N sodium hydroxide were added and the ester was hydrolysed by heating for one hour. The alcohol was distilled off and the residue acidified with hydrochloric acid when an oil separated which in a few minutes solidified. The crude acid was recrystallised twice from petroleum (b.p. 60–80°). 14.7 g pure acid were collected as white plates. M.p. 129.2–130.8°. Yield 83 %.

88.40 mg acid: 7.82 ml 0.04792-N NaOH

47.69 » » 8.40 » 0.04844-N » (combustion according to GROTE-KREKELER)

$C_9H_8O_3Cl_2$ calc. equiv.wt. 235.1; Cl 30.17
found » 235.9; » 30.25.

Preliminary experiments on resolution. Brucine, quinine, cinchonine and (–)- α -phenethylamine yielded crystalline salts containing excess of (+)-acid, brucine giving the best resolution. With strychnine and (+)- α -phenethylamine crystalline salts were obtained, which contained the (–)-form in excess. The latter base gave only slight resolution, the former being much more effective.

(–)- α -(3,4-Dichlorophenoxy)-propionic acid. 19.7 g (0.05 mole) brucine and 11.8 g (0.05 mole) inactive acid were dissolved in a hot mixture of 75 ml alcohol and 250 ml water. On cooling, the solution was seeded with crystals from a preliminary run and left over night in a refrigerator. The crystals were collected, the acid was liberated from a small sample and the rotatory power in abs. alcohol determined. The salt was recrystallised several times from dilute alcohol according to the scheme below:

Crystallisation	1	2	3	4	5
{ Ml alcohol	75	75	50	50	45
{ » water	250	250	200	200	175
Weight of salt (g)	23.4	16.3	14.2	12.9	11.8
$[\alpha]_D$ of the acid	–12.6°	–31.9°	–36.8°	–37.4°	–37.3°

The acid liberated from the salt 5 weighed 4.3 g. It was recrystallised twice from cyclohexane. 3.65 g of pure acid were obtained as small glistening needles with m. p. 119.5–121.0°.

67.90 mg acid: 6.02 ml 0.04792-N NaOH

$C_9H_8O_3Cl_2$ calc. equiv.wt. 235.1
found » 235.4

0.0996 g dissolved in abs. alcohol to 10.00 ml: $\alpha_D^{25} = -0.391^\circ$.
 $[\alpha]_D^{25} = -39.3^\circ$; $[M]_D^{25} = -92.3^\circ$.

(+)- α -(3,4-Dichlorophenoxy)-propionic acid. The partially active acid from the mother liquors from crystallisation 1 and 2 above was liberated. 6.0 g were obtained with $[\alpha]_D = +31^\circ$ in alcohol. This acid (0.025 mole) and 8.5 g (0.025 mole) strychnine were dissolved in 75 ml acetone and 200 ml water in the hot. The solution was seeded with crystals from a preliminary experiment and left over night in a refrigerator. The salt was treated as above, giving the following series of crystallisations ($[\alpha]_D$ in alcohol):

Crystallisation	1	2	3
{ Ml acetone	75	70	60
{ » water	200	180	160
Weight of salt (g)	12.4	11.5	11.0
$[\alpha]_D$ of the acid	+36.9°	+37.9°	+37.9°

The pure salt on decomposition yielded 4.3 g crude acid. After three recrystallisations from cyclohexane, 3.6 g pure acid were collected. It closely resembled the (–)-acid and melted at 119.8–121.2°.

80.75 mg acid: 7.19 ml 0.04792-N NaOH

$C_9H_8O_3Cl_2$ calc. equiv.wt. 235.1
found » 234.4

0.1063 g dissolved in abs. alcohol to 10.00 ml: $\alpha_D^{25} = +0.416^\circ$, $[\alpha]_D^{25} = +39.1^\circ$; $[M]_D^{25} = +92.0^\circ$.
0.0966 g dissolved in acetone to 10.00 ml: $\alpha_D^{25} = +0.529^\circ$, $[\alpha]_D^{25} = +54.8^\circ$; $[M]_D^{25} = +128.7^\circ$.
0.1075 g dissolved in benzene to 10.00 ml: $\alpha_D^{25} = +0.038^\circ$, $[\alpha]_D^{25} = +3.5^\circ$; $[M]_D^{25} = +8.3^\circ$.
0.0984 g dissolved in chloroform to 10.00 ml: $\alpha_D^{25} = +0.235^\circ$, $[\alpha]_D^{25} = +23.9^\circ$; $[M]_D^{25} = +56.1^\circ$.
0.1035 g neutralised with aqueous sodium hydroxide and made up to 10.00 ml: $\alpha_D^{25} = +0.151^\circ$, $[\alpha]_D^{25} = +14.6^\circ$; $[M]_D^{25} = +34.3^\circ$.

rac.- α -(2,4-Dichlorophenoxy)-propionic acid (II). This acid was prepared in the same manner as the 3,4-substituted isomer using 2,4-dichlorophenol. The crude acid was recrystallised from petroleum (b.p. 60–80°) and was obtained as big needles with m.p. 117–118°.

90.99 mg acid: 8.06 ml 0.04792-N NaOH

45.32 » » : 7.905 » 0.04844-N » (combustion according to GROTE-KREKELER)

$C_9H_8O_3Cl_2$ calc. equiv.wt 235.1; Cl 30.17
found » 235.6 » 29.96

Preliminary experiments on resolution. Crystalline salts were obtained with cinchonidine, strychnine and quinine, but except for the latter, no or very slight resolution could be detected. From the quinine salt an acid containing excess of (+)-acid could be isolated.

(+)- α -(2,4-Dichlorophenoxy)-propionic acid. 23.5 g (0.1 mole) inactive acid and 32.4 g (0.1 mole) quinine were dissolved in a warm mixture of 450 ml acetone and 350 ml water. The solution was allowed to crystallise in a refrigerator over night. The salt was recrystallised according to the scheme below ($[\alpha]_D$ in alcohol):

Crystallisation	1	2	3	4	5
{ Ml acetone	450	225	180	180	180
» water	350	175	140	140	140
Weight of salt (g).....	29.1	23.0	21.1	19.7	19.0
$[\alpha]_D$ of the acid	+16.7°	+25.4°	+25.1°	+26.8°	+26.8°

The pure salt yielded 7.65 g crude acid which was recrystallised twice from petroleum (b.p. 60–80°). 7.2 g pure acid were collected as a wadlike mass of thin needles with m.p. 122.2–123.2°.

72.48 mg acid: 6.46 ml 0.04792-*N* NaOH

$C_9H_8O_3Cl_2$ calc. equiv.wt. 235.1

found » 234.1

0.1004 g dissolved in abs. *alcohol* to 10.00 ml: $\alpha_D^{25} = +0.282^\circ$. $[\alpha]_D^{25} = +28.1^\circ$; $[M]_D^{25} = +66.0^\circ$.
 0.1049 g dissolved in *acetone* to 10.00 ml: $\alpha_D^{25} = +0.369^\circ$. $[\alpha]_D^{25} = +35.2^\circ$; $[M]_D^{25} = +82.7^\circ$.
 0.1049 g dissolved in *benzene* to 10.00 ml: $\alpha_D^{25} = -0.179^\circ$. $[\alpha]_D^{25} = -17.1^\circ$; $[M]_D^{25} = -40.1^\circ$.
 0.1031 g dissolved in *chloroform* to 10.00 ml: $\alpha_D^{25} = +0.216^\circ$. $[\alpha]_D^{25} = +21.0^\circ$; $[M]_D^{25} = +49.2^\circ$.
 0.0956 g neutralised with *aqueous sodium hydroxide* and made up to 10.00 ml: $\alpha_D^{25} = -0.135^\circ$.
 $[\alpha]_D^{25} = -14.1^\circ$; $[M]_D^{25} = -33.2^\circ$.

(-)- α -(2,4-Dichlorophenoxy)-propionic acid. As no suitable base for the isolation of the (-)-form was known it was tried to concentrate the salt of the (-)-form in the mother liquor. For that reason the mother liquors from crystallisation 1 and 2 above were evaporated to about half the volume. The salt of the (+)-acid did not, however, separate but an oil was obtained. After some hours this crystallised. A sample showed that this fraction gave an acid with $[\alpha]_D = -26^\circ$ in alcohol. An attempt to purify this salt further failed. Therefore the acid was liberated from the salt, the crude (-)-acid (3.4 g) was recrystallised twice from petroleum (b.p. 60–80°) and four times from cyclohexane. 1.9 g pure (-)-acid could be collected as thin needles. M.p. 122.5–123.2°.

72.34 mg acid: 6.41 ml 0.04792-*N* NaOH

$C_9H_8O_3Cl_2$ calc. equiv.wt. 235.1

found » 235.5

0.0978 g dissolved in abs. *alcohol* to 10.00 ml: $\alpha_D^{25} = -0.279^\circ$. $[\alpha]_D^{25} = -28.5^\circ$; $[M]_D^{25} = -67.1^\circ$.

Thermal analysis. Contact preparations were studied in a hot stage microscope according to KOFLEK (6). The results are found in table 2. All melting points have been determined in a microscope according to KOFLEK.

The author is indebted to Prof. A. FREDGA for supplying the enantiomorphic α -naphthoxypropionic acids and for valuable discussions. Thanks are due to Mr. S. LARSSON for assistance in the preparation of the racemic acids. Part of the expenses involved have been defrayed by a grant from STATENS NATURVETENSKAPLIGA FORSKNINGSRÅD.

SUMMARY

α -(3,4-Dichlorophenoxy)-propionic acid (I) and α -(2,4-dichlorophenoxy)-propionic acid (II) have been resolved into optical antipodes.

Optical measurements and quasi-racemate formation indicate that (+)-I, (+)-II, (-)- α -(1-naphthoxy)-propionic acid and (+)- α -(2-naphthoxy)-propionic acid belong to the same steric series. It is assumed that growth regulating properties of compounds of this type are related to the configuration.

Institute of Organic Chemistry, Royal Agricultural College, Uppsala, April 1952.

REFERENCES: 1. K. V. Thimann, in F. Skoog, Plant growth substances, Wisc. 1951, p. 29. - 2. A. Fredgå and M. Matell, Ark. Kemi **3**, 429 (1951). - 3. A. Fredgå, The Svedberg 1884 ³⁰/₈ 1944, Uppsala 1944, p. 261. - 4. L. and A. Kofler, Mikro-Methoden zur Kennzeichnung organischer Stoffe und Stoffgemische, Innsbruck 1948, p. 115. - 5. M. Matell, Mikrochem. mikrochim. Acta **38**, 532 (1951). - 6. L. and A. Kofler, Mikro-Methoden..., p. 3.

Tryckt den 25 oktober 1952

Uppsala 1952. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

Zum Mechanismus der Decarboxylierung. I

Von HANS VON EULER und HANS HASSELQUIST

Decarboxylierung der Dehydro-Ascorbinsäure

Dehydro-Ascorbinsäure spaltet, wie in einer vorhergehenden Mitteilung¹ erwähnt wurde, beim Erwärmen in neutraler oder schwach saurer Lösung rund 1 Mol CO₂ ab, und zwar um so schneller, je vollständiger durch Aufspaltung des Laktonringes Diketogulonsäure gebildet worden ist. Diese Decarboxylierung tritt — wie HASSELQUIST² gezeigt hat, auch an der von ihm dargestellten Verbindung von 1 Mol Diketogulonsäure mit 3 Mol Anilin ein. Diese auch an sich bemerkenswerte Reaktion steht in naher Beziehung zu der wiederholt und neuerdings besonders von W. LANGENBECK eingehend studierten Decarboxylierung der α -Ketosäuren, einer Reaktion, die an Brenztraubensäure enzymatisch mittels der von AUHAGEN³ 1932 entdeckten Co-Carboxylase (Aneurin-pyrophosphat) unter Bildung von Azetaldehyd durchgeführt werden kann, die aber auch bei Verwendung geeigneter Katalysatoren und geeigneter Azidität in nicht-enzymatischen Systemen eintritt.⁴

Bevor wir auf die Kinetik dieser Reaktionen eingehen⁵, seien hier einige präparative Ergebnisse über Produkte der Decarboxylierung und Derivate der Dehydro-ascorbinsäure erwähnt.

a. Abspaltung von Oxalsäure

Beim Erwärmen der Dehydro-Ascorbinsäure in neutraler Lösung tritt neben der CO₂-Abspaltung noch eine andere, tiefer greifende Abbau-Reaktion ein, bei welcher *Oxalsäure*⁶ auftritt.

3,52 g Ascorbinsäure, in 100 ml Wasser gelöst, wurden auf dem siedenden Wasserbad mit 2,05 g feingepulvertem p-Chinon bis zu dessen vollständiger Lösung erhitzt. Durch Zusatz von 10 ml einer 2 n. Natronlauge wurde der Laktonring rasch aufgespalten, worauf weiter erwärmt wurde, bis die CO₂-Entwicklung beendet war.

Nach Abkühlung und Zusatz von 5,6 g Phenylhydrazin-Chlorhydrat fielen aus der Mutterlauge B bei Zimmertemperatur innerhalb 24 Stunden kleine braune Krystalle aus, die nach Waschen mit etwas Wasser und Aufschlämmen mit Methanol und dann mit Äthylazetat abfiltriert wurden, und nach Umkrystallisieren aus Wasser als farblose Prismen vom Schmp 183–184° erschienen. Ausbeute 350 mg.

¹ EULER u. H. HASSELQUIST, Dieses Arkiv, 4 No 24; 1952.

² H. HASSELQUIST, Dieses Arkiv 4, No 24; 1952.

³ E. AUHAGEN, Zs. physiol. Chem. 204, 149 u. 209, 20; 1932.

⁴ Gleichzeitige Spaltung der Brenztraubensäure in Acetoin und CO₂ siehe W. DIRSCHERL u. H. HÖFERMANN, Biochem. Z. 322, 237; 1951.

⁵ Unsere theor. Erwägungen knüpfen an HUGHES u. C. K. INGOLD an (Soc. 1935, 244). Siehe auch E. D. HUGHES, Trans. Faraday Soc. 34, 185; 1938. — H. SCHENKEL u. M. SCHENKEL-RUDIN, Helv. Chim. Acta 31, 514; 1948.

⁶ Siehe hierzu auch ERLBACH u. H. OHLE, Chem. Ber. 67, 555; 1934.

Ein Mischschmelzpunkt mit Oxalsäure-phenylhydrazin-Salz ergab keine Depression.

Durch Einengen der Mutterlauge B im Vacuum schied sich ein rotbraunes Öl aus, das nicht zur Krystallisation gebracht werden konnte.

Dehydro-Ascorbinsäure + 1 Mol Phenylhydrazin in saurer Lösung

3,50 g Ascorbinsäure in 20 ml Wasser gelöst wurden mit 2,10 g p-Chinon in ätherischer Lösung oxydiert. Die wässrige Schicht wurde mit 2,8 g Phenylhydrazinchlorhydrat auf dem Wasserbad auf 60° erwärmt. Nach kurzer Zeit fielen bei Zimmertemperatur 2 g orange-gelbe Stäbchen aus, die bei 164–166° unter schwacher Zersetzung schmolzen. Umkrystallisieren aus Äthylazetat ergab grosse goldglänzende Blätter, rot in durchscheinendem Licht, Schmp 168–169°. Zur Analyse aus Methanol umkrystallisiert zeigten die Krystalle einen etwas höheren Schmp 169–169,5°. (Sbst. HH 143.)

Analyse HH 143.

Ber. für	$C_{12}H_{18}O_5N_2$	C = 54,54 %	H = 4,58 %	N = 10,60 %
Gefunden		54,50	4,58	11,04

Die Sbst. HH 143 ist schwerlöslich in Benzol, löslich in warmem Wasser, leichtlöslich in Methanol und Azeton. Bezgl. Löslichkeit, Krystallform und Schmelzpunkt stimmt diese Substanz mit dem Produkt überein, das MICHEEL und HASSE¹ aus 2-Desoxy-L-Ascorbinsäure mittels Diazoniumchlorid als 2-Mono-Phenylhydrazon der Dehydro-Ascorbinsäure erhalten haben.²

Demnach sollte bei der Umsetzung von Dehydro-Ascorbinsäure mit einem Unterschuss von Phenylhydrazin nur eine Reaktion an der Ketogruppe des C-Atoms 2 eintreten. Wir haben vergebens versucht, aus der Mutterlauge das entsprechende Hydrazon der CO-Gruppe 3 zu isolieren.

Das Phenylhydrazon der Dehydro-Ascorbinsäure (Sbst. HH 143) wurde auf seine Tumor-hemmende Wirkung an 9 Jensensarkom-tragenden Ratten geprüft.

Intramuskuläre Injektion von 5 mal je 4 mg (in wässriger Lösung), das erste mal unmittelbar nach der Implantation des Sarkoms. 9 männl. junge Tiere und 9 gleich alte Kontrolltiere.

Entwicklung der Sarkome	Injizierte Ratten	Mittel 2,8 cem Sarkom
	Kontroll-Ratten	Mittel 3,3 cem Sarkom
Gleichzeit. Gewichtszunahme	Injizierte Ratten	37,2 g
der Ratten während 10 Tagen	Kontroll-Ratten	36,4 g

Diketo-Gulonsäure + 1 Mol Phenylhydrazin

Darstellung der 2,3-Diketo-Gulonsäure-Lösung. 3,5 g Ascorbinsäure in 20 ml Wasser gelöst wurde im Scheidetrichter mit der ätherischen Lösung von 2,1 g p-Chinon geschüttelt. Die wässrige Schicht wurde mit 10 ml einer 2 n. Natronlauge versetzt

¹ F. MICHAEL u. K. HASSE, Chem. Ber. 69, 879; 1936.

² F. MICHAEL u. R. MITTAG, Zs. physiol. Chem. 247, 34; 1937.

um den Laktoring zu öffnen, hierauf wurde die Diketosäure durch Zusatz von 5 ml 4 n. HCl freigemacht.

Die Phenylhydrazin-Lösung wurde aus 2,8 g dem Hydrochlorid und 10 ml 2 n. Natronlauge in Äther dargestellt.

Die wässrige Lösung der Diketosäure und die ätherische Lösung des Phenylhydrazins wurden 5 Min. geschüttelt. Die Ätherschicht wurde abgetrennt, die Wasserschicht mit Äthylazetat ausgeschüttelt, mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, abfiltriert, bei Zimmertemperatur eingengt und lieferte dann grosse, bräunliche rhombische Prismen. Ausbeute 1 g, Schmp 140° (Zersetzung). Die in Äthylazetat und in Wasser leicht lösliche Substanz HH 144 liefert beim Zerkleinern der Krystalle ein gelbes Pulver.

Analyse HH 144.

Ber. für	$C_{12}H_{16}O_7N_2$	C = 48,00 %	H = 5,37 %	N = 9,33 %
Gefunden		48,56	5,68	9,72

Die Substanz HH 144 erweist sich also als das Phenylhydrazin-Salz der 2,3-Diketo-Gulonsäure.

Azetylierung des Mono-Hydrazons der Dehydro-Ascorbinsäure

1 g Mono-Hydrazon der Dehydro-Ascorbinsäure (Sbst. HH 143) wurde mit 5 ml Essigsäureanhydrid 5 Minuten gekocht, wobei alles in Lösung ging. Nach Abkühlen und tropfenweisem Zusatz des gleichen Volumens Wasser begann beim Stehen über Nacht die Krystallisation. Weiteres Wasser wurde vorsichtig zugesetzt bis Abscheidung von Öl begann. In diesem Stadium wurden die Krystalle abfiltriert und mit einigen Tropfen Eisessig gewaschen. Das Rohprodukt, kleine gelbe Krystalle, schmolz bei 117–120°.

Nach Umkrystallisieren aus Äthylazetat wurde die Substanz 145 in Form gelber bis gelbroter Nadeln vom Schmp 133–135° erhalten.

Analyse HH 145.

Ber. für	$C_{14}H_{12}O_5N_2$	C = 58,33 %	H = 4,20 %	N = 9,72 %
Gefunden		58,23	4,19	9,64

Die Substanz ist leichtlöslich in Aceton, ziemlich leichtlöslich in Benzol, Chloroform, Äthylazetat, wenig löslich in warmem Wasser.

Wird Subst. HH 143 mit 2 n. Natronlauge erwärmt, so erhält man nach Ausfällung des Produktes gelbe Krystalle vom Schmp 170–171°.

Laktoring-Spaltung am Monophenylhydrazon der Dehydro-Ascorbinsäure

50 mg der Subst. 143 wurden mit 5,2 ml 2 n. Natronlauge vorsichtig erwärmt, wobei die Farbe der Lösung in etwa 1 Minute von rot in gelbrot umschlug. Die abgekühlte Lösung wurde mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt und mit Essigsäure angesäuert, wodurch das Reaktionsprodukt in gelbroten Flocken ausfiel, die, abfiltriert und mit etwas Wasser gewaschen, bei 165–167° schmolzen. Dieses Rohprodukt (120 mg) lieferte durch zweimaliges Umkrystallisieren aus Methanol gelbe prismatische Nadeln vom konstanten Schmelzpunkt 170–171°.

Da dieser Schmppt nahe an dem des Ausgangsmateriales (169–169,5°) lag wurde der Mischschmelzpunkt bestimmt, der deutlich eine Depression ergab (159–165°). Die Subst. 149 ist leichtlöslich in Alkali, ziemlich leichtlöslich in Methanol und in siedendem Wasser. Die Subst. 149 ist identisch mit der durch Lösen des Mono-phenylhydrazons in Alkali entstandenen, welche zu Injektionen in sarkomatöse Ratten verwendet wurde (vgl. S. 480).

Wie einleitend erwähnt wurde, spaltet Dehydro-Ascorbinsäure nach Übergang in Diketogulonsäure CO_2 ab, was ja der allgemeinen Reaktion der α , Diketo-Karbonsäuren entspricht. Erwärmt man also Dehydro-Ascorbinsäure in wässriger saurer Lösung, also etwa bei $\text{pH} = 2-3$, so verlaufen gleichzeitig 2 Reaktionen, nämlich die Öffnung des Laktorringes und die Decarboxylierung der dadurch entstehenden Diketosäure (vgl. z. B. Fig. 1); beide sind von pH in verschiedener Weise abhängig; nur die Decarboxylierung wird von Anilin beeinflusst.

Der in kinetischer Hinsicht sicher bestehende Zusammenhang dieses Reaktionstypus mit der Decarboxylierung der Brenztraubensäure und anderer Mono-keto-Carbonsäuren ist noch nicht vollständig aufgeklärt. In beiden Fälle ist der Einfluss aromatischer Amine sowie der Einfluss der Konzentration bemerkenswert.

Messungs-Methodik der Decarboxylierung

Die zu den kinetischen Versuchen verwendete Dehydro-Ascorbinsäure-Lösungen, die wie früher dargestellt wurden durch Oxydation der gelösten Ascorbinsäure (1,76 g in 5 ml Wasser mit einer Lösung von 1,05 g p-Chinon in 50 ml Äther) war nie älter als 2 Tage.

In dem in das Wasserbad eintauchenden Reaktionsgefäß befanden sich 20 ml dest. Wasser. Stickstoff, der das Reaktionsgefäß durchströmte wurde in eine Barytlösung geführt. Sobald das Wasser die konstante Temperatur von 85° angenommen hatte wurde der zu decarboxylierende Stoff (Dehydro-Ascorbinsäure oder Diketo-Gulonsäure oder Brenztraubensäure) und ev. die katalysierende Base zugegeben. Stickstoff, der das Reaktionsgefäß durchströmte wurde in eine Barytlösung geleitet. Von Zeit zu Zeit wurde das gebildete Baryumcarbonat durch ein Glasfilter abfiltriert, mit Wasser und Äthanol gewaschen. bei 105° getrocknet und gewogen.

Beispiel. 0,9 ml Dehydro-Ascorbinsäurel. Totalvolumen 20 ml.

Acidität: Beginn pH 2,3; Schluss pH 1,7.

Minuten	mg BaCO_3	mg CO_2	Berechnet mg CO_2 total
23	30,6	7,2	
44	95,5	22,5	
65	196,9	46,4	
85	283,9	66,8	79,4

Decarboxylierung der Diketo-Gulonsäure

Diketo-Gulonsäure spaltet in wässriger Lösung unter Bildung einer noch nicht isolierten Säure mit erheblicher Geschwindigkeit CO_2 ab, und zwar ohne Zusatz eines Katalysators. Bei welcher Acidität das Maximum dieser Reaktion bzw. das Minimum der Stabilität der Diketo-Gulonsäure liegt, ist noch nicht festgestellt.

Was den Einfluss von Anilin und anderen N-Basen auf Diketo-Gulonsäure betrifft,

so ist zunächst zu erinnern an das Verhalten der von HASSELQUIST¹ isolierten trianilids (Sbst. 140), aus welcher 0,8 Mol. CO₂ per Mol. Diketosäure entstehen.

Auch Diketo-Gulonsäure-mono-Anilid spaltet CO₂ ab.

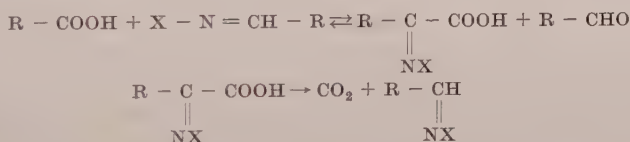
Der Einfluss des Anilins auf die Decarboxylierung der Diketo-Gulonsäure ist nicht spezifisch, vielmehr kann Anilin durch andere Stickstoffbasen (welche ebenfalls zu Schiff's Basen führen) ersetzt werden. Indessen treten dabei, z. B. mit dem Hydrazid noch andere Reaktionen (Ringbildungen) ein.

Auf die Frage, in welcher Weise N-Basen die CO₂-Abspaltung aus Diketo-Gulonsäure beeinflussen kommen wir unten zurück.

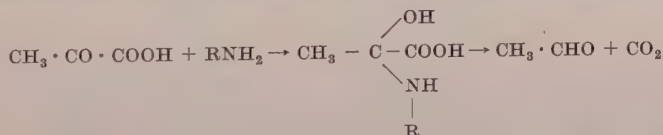
Decarboxylierung der Brenztraubensäure

Brenztraubensäure ist in wässriger Lösung innerhalb eines weiten pH-Gebietes bei Temperaturen unter 50° recht stabil. Unter der Einwirkung ultravioletter Strahlen tritt schon bei Zimmertemperatur Abspaltung von CO₂ (aus 1 n. Lösung 21 ml per 30 Minuten) ein.² Der effektivste Spaltungskatalysator ist bekanntlich die Carboxylase mit ihrer Wirkungsgruppe Aneurin-Pyrophosphat (der Auhagen'schen Co-Carboxylase). W. LANGENBECK³ hat eine Reihe von Aminen auf ihre katalytische Fähigkeit an Brenztraubensäure geprüft und hat den Mechanismus dieser Decarboxylierung studiert. Rein empirisch hatte bereits 1877 BÖTTINGER⁴ einen kräftigen Einfluss des Anilins auf die Brenztraubensäure-Spaltung gefunden (siehe unten) und U. BOKLUND⁵ konnte diese Beobachtungen bestätigen.

LANGENBECK hat die katalytischen Wirkungen des Anilins und anderer Amine auf Phenylglyoxylsäure und Brenztraubensäure auf die Bildung von Verbindungen vom Typus der Schiff'schen Basen zurückgeführt, und gibt das folgende allgemeine Reaktionsschema an:



BOKLUND formuliert die Hauptreaktion schematisch folgendermassen:



Diese Formulierung entspricht aber nicht vollständig dem Verlauf der Decarboxylierung in Gegenwart von Anilin.

Die Bildung eines Moleküls vom Bau $\text{R} - \overset{\overset{\text{N} - \text{C}_6\text{H}_5}{\parallel}}{\text{C}} - \text{COOH}$ kann natürlich nicht in

Abrede gestellt werden. Andererseits ziehen wir aus unseren Versuchen und besonders aus der Konzentrationsfunktion und aus dem Einfluss der Acidität auf die

¹ H. HASSELQUIST, Dieses Arkiv 4, 24; 1952.

² EULER, Zs. physiol. Chem. 71, 311; 1911.

³ W. LANGENBECK u. R. HUTSCHENREUTER, Z. anorg. u. allg. Chem. 188, 1; 1930.

⁴ C. BÖTTINGER, Lieb. Ann. 188, 293; 1877.

⁵ U. BOKLUND, Biochem. Z. 226, 56; 1930.

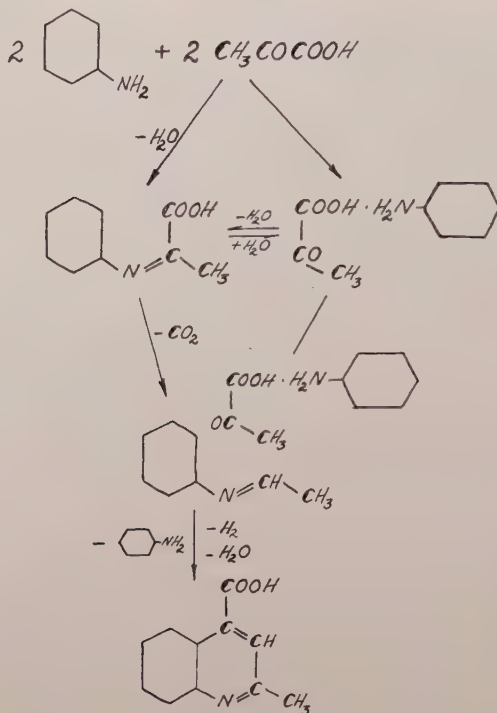
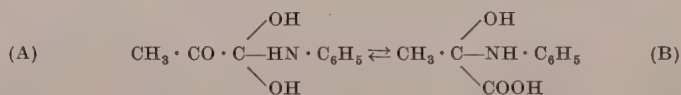


Fig. 1. 2-Methyl-chinolin-carbonsäure-4.

Spaltungsgeschwindigkeit den Schluss, dass für die reaktionsvermittelnde Molekularität der Eintritt des aromatischenamins in die Carboxylgruppe wesentlich ist. Wir nehmen an, dass zwischen Brenztraubensäure und Anilin eine nicht-ionisierende Verbindung A vorliegt, die mit der Struktur B vom Typus einer Schiff'schen Base im Gleichgewicht steht.



(Aus dem an der Wasserstoffbrücke sich spaltenden Molekül kann primär $\text{OC} = \text{N} \cdot \text{C}_6\text{H}_5$ entstehen, das schnell in CO_2 und Anilin zerfällt.)

Nun ist von C. BÖTTINGER¹ aber schon beobachtet worden, dass sich aus Brenztraubensäure und Anilin eine als Aniluvitonin bezeichnete Säure der Chinolinreihe bildet, die sich als Methyl-Chinolin-γ-Carbonsäure (Cinchoninsäure) erwies. Keinesfalls kann also auf 1 Mol Brenztraubensäure 1 Mol CO_2 entwickelt werden. Nach unseren Erfahrungen kann die Gesamtreaktion durch Fig. 1 formuliert werden: Eine analoge Reaktion tritt auch mit nur 1 Mol Anilin und 2 Mol Brenztraubensäure ein. Der Wasserstoff wird zur Bildung von Tetrahydrochinolin verwendet.

C. DÖBNER¹ hat schon 1887 die Versuche von BÖTTINGER weiter verfolgt und fand, dass alle untersuchten Aldehyde mit Brenztraubensäure und Anilin in alko-

¹ C. BÖTTINGER, L. c. und Lieb. Ann. 191, 321; 1878. — Chem. Ber. 14, 90; 1881. — Siehe auch O. DÖBNER, Lieb. Ann. 242, 265; 1887.

holischer Lösung digeriert, α -Alkyl-Chinolin- γ -Carbonsäure liefern. Von anderen Forschern wurde die DÖBNER'sche Untersuchung dann erweitert¹ und — auch an Phenylbrenztraubensäure — in verschiedenen Richtungen fortgesetzt, auf die wir hier nicht näher eingehen können.

Hingewiesen sei auf eine in diesem Zusammenhang bemerkenswerte Arbeit von SVEN BODFORS², der als wahrscheinlichste Deutung der DÖBNER'schen Chinolinbildung angibt, dass die Chinolinbildung bimolekular verläuft, in der Weise, dass zuerst zwei der drei Komponenten ein intermediäres Kondensationsprodukt geben, das sich nachher mit dem dritten Körper der Chinolinbildung unterwirft.

Die DÖBNER'sche Reaktion der Aldehyde mit Brenztraubensäure und aromatischen Aminen hat, etwa zur gleichen Zeit, eine praktisch-analytische Anwendung gefunden: Die bei der alkoholischen Gärung nach NEUBERG als Zwischenprodukt entstehende Brenztraubensäure wurde von GRAB durch Schütteln der gärenden Zuckerlösung mit ätherischer β -Naphthylamin-Lösung³ mittels α -Methyl-Naphto-Cinchoninsäure abgegangen, und diese Methode ist dann von CAGAN⁴ durch Anwendung von Isovaleraldehyd statt Acetaldehyd noch verbessert worden.

Einfluss einiger aliphatischer Amino-Verbindungen auf die Decarboxylierung der Brenztraubensäure

Wie erwähnt, ist schon mehrmals versucht worden, verschiedene Amine als Co-Carboxylasen zu verwenden. Amino-Oxindol soll sich in dieser Hinsicht als wirksam erweisen(?) Im Anschluss an obige Versuche mit Anilin haben wir auch einige aliphatische Amine auf eine ev. katalytische Wirkung hin geprüft.

Diese Wirkung hat sich bei den meisten der untersuchten Amine als sehr schwach erwiesen. Unter den Stoffen, welche erheblichen Einfluss auf die CO₂-Abspaltung aus Brenztraubensäure zeigen, sind zu erwähnen:

Brenztraubensäure und Glykokoll

6 ml Brenztraubensäure-Lös. (70,7-%ig) 0,6 Mol, 4,5 g Glykokoll 0,6 Mol. Temp. 76–78°.

Min.	mg BaCO ₃	mg CO ₂	% CO ₂ der Theorie
60	2329	550	20,8
		2646	

Brenztraubensäure und Laktopepton

6 ml Brenztraubensäure-Lös. (70,7-%ig), 3 g Laktopepton. Temp. 83–85°.

Min.	mg BaCO ₃	mg CO ₂	% CO ₂ der Theorie
60	1584	372	14,1
		2646	

Herrn Ingenieur BERTIL EGNELL danken wir bestens für eifrige Mitarbeit.

Stockholm, Universität, Inst. f. organ. chem. Forschung.

¹ W. BORSCHKE, Chem. Ber. 42, 4072; 1909.

² SVEN BODFORS, Lieb. Ann. 455, 41; 1927.

³ Vgl. auch DOEBNER u. MITARB., Chem. Ber. 27, 2020; 1894.

⁴ S. N. CAGAN, Zs. angew. Chem. 39, 951; 1926.

Tryckt den 10 oktober 1952

Uppsala 1952. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

Zur Kenntnis des Buttergelb-Hepatoms und seiner Entstehung. II

Von HANS VON EULER, HANS HASSELQUIST und ERIK ERIKSSON

Mit 1 Figur im Text

Die hier mitgeteilten Versuche beziehen sich auf Lebern von Ratten unseres norwegischen Stammes, welche längere oder kürzere Zeit (Monate, Tage, Stunden) Tagesdosen von 10–30 mg Buttergelb erhalten aber noch kein Hepatom ausgebildet hatten.

Wie man durch die Versuche amerikanischer Forscher, besonders von E. und J. MILLER¹ und von E. STEVENSON² weiss, wird Buttergelb bereits kurze Zeit nach Einnahme per os aus dem Organismus zum grössten Teil wieder ausgeschieden, und zwar teils unverändert, teils nach Demethylierung als Monomethyl-Aminoazobenzol und Azobenzol, teils nach reduktiver Spaltung in Anilin und *p*-Phenylendiamin.

Es war ein Ziel unserer Untersuchung, Anhaltspunkte darüber zu gewinnen, ob ein wesentlicher Anteil des aus dem Organismus wieder ausgeschiedenen Azofarbstoffes vorher zu keiner Wirkung gekommen ist, oder ob man annehmen kann, dass sich die *gesamte* eingegebene Buttergelbmeng an der cancerogenen Wirkung beteiligt. Die Beantwortung dieser Frage ist für die Einsicht in den Mechanismus der cancerogenen Wirkung von wesentlicher Bedeutung.

DRUCKREY³ hat vor kurzer Zeit seine Ergebnisse folgendermassen zusammengefasst:

„Quantitative Versuche mit cancerogenen Substanzen haben uns (DRUCKREY u. KÜPFMÜLLER, Z. f. Naturforsch. 3 b, 254; 1948) am Beispiel des Buttergelbs gezeigt, dass der Krebs nur bei dauernder Gabe des Farbstoffs, und zwar um so *früher* entsteht, je höher die täglich applizierte Dosis, also die Konzentration des Giftes am Wirkungsort ist. Die doppelte Tagesdosis erzeugte doppelt so schnell, d. h. in der halben Zeit Krebs, wie die einfache, die halbe Tagesdosis dagegen in der doppelten Zeit.

Die *Gesamtdosis* Buttergelb, die an einem definierten Objekt zur Krebserzeugung erforderlich ist, ist also immer dieselbe, ohne Rücksicht auf die Zeit, über die sie —

¹ ELISABETH MILLER and JAMES MILLER, Cancer Research, 7, 468; 1947. — J. MILLER and C. A. BAUMANN, Cancer Research 5, 227; 1945. — Siehe auch die Zusammenfassung von E. und J. MILLER: The Biochemistry of Hepathic Carcinogenesis, Deutsch von HANS NOTHEDURFT, Verlag Unger und Domröse, Herne i. W.

² E. STEVENSON, K. DOBRINER and C. P. ROADS, Cancer Research 2, 106; 1942.

³ H. DRUCKREY, Z. f. Krebsf. 57, 70; 1950.

von Extremfällen abgesehen — verteilt wird. Die Wirkung ist „zeitunabhängig“, ebenso wie z. B. die Mutation auslösende Wirkung von Strahlen. Diese Verhältnisse treffen beim Buttergelb auch dann noch zu, wenn die täglich aufgenommene Menge des Farbstoffs so klein ist, dass die „kritische“ Gesamtdosis erst am Lebensende der Tiere erreicht wird. Dennoch entsteht Krebs.“

„Aus diesen Ergebnissen folgt, dass die Einzelwirkungen auch der kleinsten Tagesgaben sich verlustlos summieren, also vollständig *irreversibel* sind, wie die krebsige Entartung selbst ein irreversibler Vorgang ist.“

Bevor man versucht, die Hauptfrage zu beantworten, unter welchen Umständen die zeitunabhängige Summationswirkung der Buttergelbdosen und die Irreversibilität der Krebsentstehung zutrifft, wird man sich zu entscheiden haben, in welcher Weise bei der Prüfung des Summationsgesetzes die aufgenommene Menge Buttergelb in Rechnung zu setzen ist.¹ Vor allem erscheint es wichtig zu wissen, in welcher Konzentration das per os eingegebene Buttergelb in die Leber gelangt, und in welcher Konzentration der Farbstoff dort — frei oder gebunden — eine gewisse Zeit verweilt.

Den grossen Einfluss der Diät auf die Entwicklung der Hepatome nach Buttergelb-Eingabe haben besonders E. und J. MILLER² und ihre Mitarbeiter, ferner GRIFFIN³, BAUMANN, OPIE⁴, ferner japanische Forscher, FUJIWARA, NAKAHARA⁵, KINOSHITA studiert. Unsere Versuche betrafen bisher hauptsächlich

1. den Einfluss einer Buttergelb-haltigen Diät auf die Katalase-Wirkung der Leber,
2. biochemische Reaktionen des Buttergelbs mit Bestandteilen des Lebergewebes in vivo und in vitro und zwar besprechen wir in dieser Mitteilung nur Versuche an Lebern im präcancerösen Zustand, also an Lebern, in welchen noch kein Hepatom makroskopisch oder histologisch nachweisbar war.⁶

Zur Methodik der Tier-Behandlung

Nach orientierenden Versuchen, bei welchen die Ratten die in diesem Institut übliche und wiederholt beschriebene Grundkost erhalten hatten, gingen wir bald definitiv zu einer Diät über, in welcher besonders der Riboflavin- und der Protein-Gehalt niedrig eingestellt wurde.

Stockholmer Kost der Buttergelb-Ratten:

Milchpulver	15 %	Mais	5 %
Zucker	5 %	Trockenhefe	2,5 %
Stärke	25 %	Salzmischung	2,5 %
Kleie	35 %	Fett	5 %

enth. 0,6 % Butterg.

¹ Man hat Anlass zu bezweifeln, dass die Gesamtmenge des in den Magen-Darmtraktus eingeführten Buttergelbs vollständig oder zu einem konstanten Bruchteil zur cancerogenen Wirkung kommt.

Unter gewissen Bedingungen würde ein Summationsgesetz auch dann gelten, wenn nur ein kleiner, aber konstanter Bruchteil der per os eingegebenen Farbstoffmenge zur cancerogenen Wirkung kommt.

² MILLER, E., MILLER, J., B. E. KLINE, H. P. RUSCH, J. exp. Med. 88, 89; 1948. — H. P. RUSCH et al. Am. Ass. Adv. Sc. Res. Conf. Cancer, 267, 11945. — M. DYER, J. Nat. Cancer Inst. 11, 1073; 1951.

³ A. C. GRIFFIN and C. A. BAUMANN, Cancer Res. 8, 279; 1948.

⁴ E. L. OPIE, J. exp. Med. 80, 219; 1944.

⁵ NAKAHARA et al., Gann, 30, 499; 1936. — 33, 57; 1939.

⁶ Der verwendete, weisse (norweg.) Rattenstamm des Instituts scheint gegen Buttergelb exceptionell resistent zu sein, wie später ausführlich gezeigt werden soll.

Ausserdem wurden 30 bzw. 15 mg Buttergelb 3 mal per Woche in Arachidöl-Lösung mit Pipette per os langsam eingegeben, und zwar den älteren Tieren 1 ml, den jüngeren 0,5 ml Öl-Lösung. Dies entspricht einer *täglichen Buttergelb-Zugabe von 13 mg*.

Die schwer vermeidbaren Verluste, *höchstens* 10 % des einzugebenden Volumens, wurde durch entsprechende Mehrgabe (über die berechnete Menge) kompensiert.

Versuche

I. Katalase-Wirkung der Lebern von normalen und mit Buttergelb-Zusätzen ernährten Ratten

Unsere früheren Versuche¹ haben in Übereinstimmung mit denen anderer Forscher gezeigt, dass die Katalase-Wirkung der Rattenlebern mit dem Alter der Tiere *stark zunimmt*; in den folgenden Tabellen haben wir daher stets das Alter der Versuchstiere angegeben und haben nur Tiere angenähert gleichen Alters zu Vergleichen bezüglich des Einflusses der Cancerisierung herangezogen.

Dass Lebern von Tumor-Patienten einen geringeren Katalase-Gehalt aufweisen als normale menschliche Lebern wurde in den Jahren 1910–1916 von COLWELL, ROSENTHAL und VON BRAHN gefunden. Durch eingehende Versuche hat J. P. GREENSTEIN² gezeigt, dass in Lebern von Jensensarkomen — sowie transplantierten Lebertumor — Nr. 31 tragenden Ratten der Katalase-Gehalt *sehr wesentlich kleiner* ist als in normalen Ratten-Lebern.

Durch Versuche, das Lebergewebe normaler und sarkomatöser Ratten mittels differentieller Zentrifugierung zu fraktionieren hat sich gezeigt³, dass eine Senkung der Katalase-Aktivität der Mitochondrien erst eintritt, wenn der rasch wachsende Tumor eine gewisse Grösse erreicht hat. Wie gleichzeitig nachgewiesen wurde, entfällt der überwiegende Teil der Katalase-Aktivität der Leberzelle auf die extramitochondriale Fraktion des Cytoplasmas, entsprechend dem von BRACHET⁴ an Hefezellen gemachten Befund.

Eine ausreichende Erklärung für die niedrigen Katalase-Werte sarkomatöser Lebern konnte noch nicht gegeben werden, NAKAHARA⁵ hat dieselbe auf eine im Blut tumorkrankter Organismen kreisende *toxische Substanz* („toxisches Hormon“) zurückgeführt.

Methodik. Die Lebern kamen sofort nach Dekapitierung der Tiere zur Untersuchung, und zwar wurde bei allen Versuchen jeder der 4 Leber-Lappen (siehe Fig. 1) gesondert gewogen und auf sein Trockengewicht geprüft. Die Leber-Lappen wurden im Mörser mit 1/15 n. Phosphatpuffer-Lösung (pH = 6,90) fein zerrieben. Von diesem dünnen Brei wurden 0,5 ml entnommen und mit Wasser auf 100 ml verdünnt. Von dieser verdünnten Lösung L wurde per Probe 1 ml zur Katalase-Bestimmung verwendet.

¹ EULER und A. GLASER, Dtsche Med. Wochenschr. 75, 631; 1950. — WEIL-MALHERBE und R. SCHADE, Biochem. J. 43, 118; 1948.

² J. P. GREENSTEIN und Mitarb., J. Nat. Canc. Inst. 1, 687; — 2, 17, 283, 293, 345, 525. — 3, 397; 1943. — 4, 283; 1944. Siehe auch EULER, EULER und HASSELQUIST, Dieses Arkiv, 4, 33; 1952.

³ EULER und LEO HELLER, Zs. f. Krebsforsch. 56, 393; 1949.

⁴ J. BRACHET, Soc. exp. Biol. Symp. No 1, 213; 1947.

⁵ W. NAKAHARA und F. FUKUOKA, Gann 40, 45; 1949. — 42, 55; 1951.

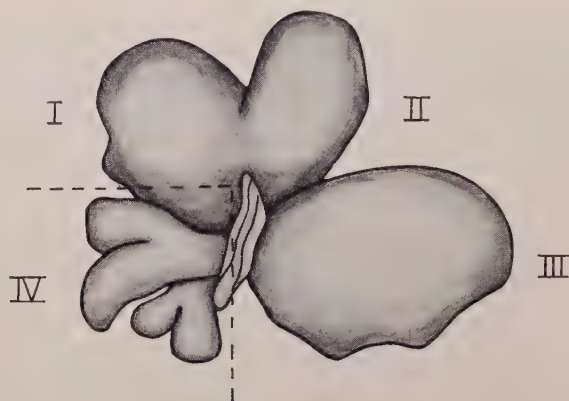


Fig. 1. Die 4 untersuchten Teile (Lappen) der Ratten-Lebern.

Reaktionsmischung per Probe: 1 ml der Lösung L + 10 ml 0,01 n. H_2O_2 standen bei 0°; nach 0 resp. 5, 10 u. 15 Minuten wurden Proben entnommen, in 5 ml 4 n. Schwefelsäure einpipettiert und mit 0,01 n $KMnO_4$ -Lös. titriert.

k = Reaktionskonst. 1. Ordnung. — Kat f berechnet nach EULER u. JOSEPHSON (Chem. Ber. 56, 1749 (1923)).

Als Beispiel geben wir für *einen* Versuch (Normale Ratte VM geb. April 1951, Gew. 258 g) die Versuchszahlen ausführlich an.

Für die übrigen, durchweg in gleicher Weise durchgeführten und berechneten Versuche geben wir der Raumersparnis wegen in der Tabelle 2 nur die Mittelwerte $k \cdot 10^3$ und Kat f an.

Zu den in Tab. 1 angegebenen Werten von $k \cdot 10^3$ (Mittel aus 3 Konstanten und Kat f (Katalase-Wirkung per g Trockengewicht Leber) ist folgendes zu bemerken: In keiner der untersuchten Lebern konnte ein Hepatom bemerkt werden, obwohl die Ratten eine Gesamtdosis von je 700 mg Buttergelb, über einen Zeitraum von 60 Tagen gleichheitlich verteilt erhalten hatten.

Tabelle 1.

Lappen	Minuten	$a - x$	$k \cdot 10^3$	Mittel	Kat. $f \cdot 10^{-1}$
I. 1,89 g Verwendet 263 mg	5	8,00	32	32	39
Trockengew. 83,0 mg	10	5,35	33,5		
$a = 11,60$	15	4,00	31		
II. 1,08 g Verwendet 264 mg	5	7,40	39	36	44
Trockengew. 83,6 mg	10	5,00	36,5		
$a = 11,60$	15	3,70	33		
III. 3,41 g Verwendet 253 mg	5	9,10	21	21	38
Trockengew. 79,2 mg	10	7,50	19		
$a = 11,60$	15	5,10	24		
IV. 3,61 g Verwendet 274 mg	5	7,90	33	32	38
Trockengew. 85,8 mg	10	5,35	33		
$a = 11,60$	15	4,05	30		

Tabelle 2.
Katalase-Wirkung.

Gruppe	Ratte	Totaldosis Buttergelb	Alter Monate	Leber-Lappen							
				I		II		III		IV	
				$k \cdot 10^3$	Kat f	$k \cdot 10^3$	Kat f	$k \cdot 10^3$	Kat f	$k \cdot 10^3$	Kat f
A	Normal		5—6	32	42	39	55	27	37	17	25
1	Buttergelb Nr 9	1750 γ	5—6	23	29	27	36	20	27	31	37
2	Buttergelb Nr 5	1600 γ	5—6	18	22	22	25	18	23	16	19
3	Buttergelb Nr 19 ..	1400 γ	5—6	18	25	19	28	19	24	13	19
B	Normal		11	49	75	43	61	55	80	56	75
	Normal		11	32	39	36	44	21	38	32	38
	Normal		11	36	50	33	46	33	46	37	48
4	Buttergelb 3 St.	30 γ	11	30	38	37	46	38	45	23	28
5	Buttergelb 3 St.	30 γ	11	24	31	25	36	26	37	30	40
C	Normal		3	26	38	39	57	32	43	51	69
	Jensensarkom		3	14	21	17	36	20	30	16	26

Grundkost: Gruppe A Ratte 1: Die letzten 5 Wochen Protein- und B₂-arm
 » A » 2: Die letzten 4 Wochen » » »
 » A » 3: Die letzten 8 Wochen » » »

Wir stellen für jede der beiden Altersgruppen von 6 bzw. 11 Monaten die Mittelwerte von Kat f zusammen.¹

		I	II	III	IV
6 Monate	Normal	42	55	37	25
	Buttergelb-Behandl.	25	30	25	25
11 Monate	Normal	55	50	55	54
	Buttergelb-Behandl.	35	41	41	34

In der Gruppe A ist der Einfluss des Buttergelbs deutlich. Auffallend ist, dass dies auch in der Gruppe B zutrifft, in welcher die Wirkungsdauer des Farbstoffs nur 3 Stunden betrug. Die Kat f -Werte der einzelnen Leber-Lappen scheinen von der Diät und von der zwischen der letzten Nahrungsaufnahme und der Dekapitierung verfloßenen Zeit abzuhängen. Tagesperioden des Katalase-Gehaltes der Leber haben wir nicht festgestellt.

II. Aufnahme und Umwandlung des Buttergelbs im Rattenorganismus

Die Fragestellungen, auf die wir unsere Arbeit konzentriert haben, sind in einer vorhergehenden Mitteilung bereits erwähnt worden und können folgendermassen präzisiert werden:

1 a) Wird der mutagene Effekt im Tierorganismus vom Buttergelb selbst (bzw. einem Buttergelb-Derivat) in einer rel. schnell verlaufenden Reaktion hervorgerufen?

¹ Die Versuchsfehler der einzelnen Kat f -Bestimmung dürften 5 % nicht übersteigen. Erheblich grösser sind in den einzelnen Lappen (am grössten in Lappen IV) die individuellen Variationen.

1 b) durch die Verbindung des Buttergelbs mit einer spezifischen selbstreproduzierenden Substanz, etwa einem Virus-artigen Nukleoprotein, sodass die Buttergelb-Wirkung begrenzt wäre durch die Menge der im Organismus bzw. in der Leber vorhandenen (noch nicht pathogenen) Virus-Vorstufe (Prävirus)? Oder aber

2) ist die eigentliche Ursache des mutagenen Effektes eine *Reaktion* (etwa eine an einem spezifischen Nukleoprotein eintretende Reduktion oder Bindung), begleitet von einer mit Elektronen-Verschiebung verbundenen Energie-Entwicklung? In diesem Fall wäre die Wirkung jeder Buttergelb-Dosis unabhängig von den weiteren Vorgängen am eingeführten Farbstoff.

In der gleichen Mitteilung wurde bereits auf die chemischen Ergebnisse von E. und J. MILLER sowie von STEVENSON hingewiesen.

Um die biochemischen Vorgänge kennen zu lernen, welche an Buttergelb in vivo eintreten können, wurden zunächst unsere orientierenden in vitro-Versuche weiter geführt.

Was die Reduktion betrifft, welcher das Buttergelb im Organismus zweifellos unterliegt, so war zunächst aufzuklären, welcher Bestandteil des Organismus die erforderliche starke Wasserstoff-Donator-Wirkung zu leisten vermag. Die Reduktion des Buttergelbs zur entsprechenden Hydrazo-Verbindung kann im Verdauungstraktus beginnen und im Blut und dann in der Leber fortgesetzt werden, deren Reduktions-Systeme also für die Bildung der Hydrazo-Verbindung in Betracht kommen.

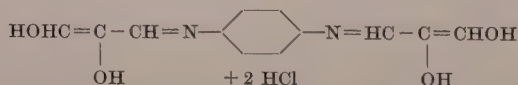
Die zum Nachweis des *p*-Phenylendiamins verwendete Testreaktion mit Triose-Redukton beruht auf der Bildung einer Schiff'schen Base mit dieser Substanz. Dies wurde durch den folgenden präparativen Versuch bewiesen, der zur Isolierung des Bi-(phenylendiamin)-Reduktions bezw. dessen salzsauren Salzes geführt hat.

Umsatz des Reduktions mit *p*-Phenylendiamin

200 mg Redukton (4 Mol) wurden in 5 ml 1 n. HCl gelöst. Die Lösung wird in einem Erlenmeyerkolben filtriert und mit einer Lösung von 62,5 mg *p*-Phenylendiamin (1 Mol) in 26 ml HCl (1 : 1) unter Umrühren versetzt. Nach etwa 1 Minute krystallisiert das Reaktionsprodukt in Form gelber langer Stäbchen aus, die abfiltriert und in etwas Wasser gewaschen wurden. Diese Substanz HH 146 konnte aus den üblichen Lösungsmitteln nicht umkrystallisiert werden, da sehr leicht Verharzung eintritt.

Analyse HH 146:

Berechnet f. $C_{12}H_{12}O_4N_2 \cdot 2 HCl$	C = 44,87	H = 4,39	N = 8,72	Cl = 22,1
Gefunden	43,57	4,82	8,36	23,3



Die Substanz enthält 2 Endiol-Gruppen und reduziert demgemäss Tillmans' Reagenz.

7,2 mg Sbst. 146 in Wasser-Alkohol gelöst wurde mit überschüssigem NaAc versetzt und mit 0,01 n TR titriert. Verbrauch 8,70 ml TR-Lösung.

$$E_{\text{gef.}} = \frac{7,2}{0,01 \cdot 8,70} = 82.$$

E_{ber} für 2 Mol Redukton + 1 Mol *p*-Phenylendiamin + 2 HCl 80
 E_{ler} für 1 Mol Redukton + 1 Mol *p*-Phenylendiamin + 2 HCl 128

Reduktionsversuche in vitro

200 mg Buttergelb in 10 ml Methanol gelöst wurden mit 400 mg Cystein-Hydrochlorid (etwas mehr als 2 Mol) versetzt; die nun saure und deshalb rote Lösung wurde 6 Stunden auf dem Wasserbad auf 100° erhitzt, stand hierauf 18 Stunden bei 20° und wurde dann auf ein kleines Volumen eingeeengt. Es fielen farblose Krystalle aus, die mit wenig Methanol gewaschen wurden und sich in fast quantitativer Ausbeute als Cystin erwiesen. Aus dem Filtrat konnte nach dem Eindunsten 50 mg unverändertes Buttergelb isoliert werden.

Das Filtrat (wässrige Lösung) war grün und ging bei Zufügen von HCl in dunkelblau über; der Farbstoff war mit Äthylacetat nicht extrahierbar. Mit dieser Lösung wurden folgende Versuche ausgeführt:

- 1) 1 ml Lös. + einige Tropfen Redukton ergab starke Gelbfärbung.
- 2) 1 ml Lös. + einige Kryställchen CuSO_4 + Kaliumpersulfat ergab vorübergehende Vertiefung der grünen Farbe bis schwarz und wenig schwarze Fällung.

Zum Vergleich dienten folgende Reaktionen:

- a) Anilinwasser + Redukton + wenig HCl ergab schwache Gelbfärbung.
- b) *p*-Phenylendiamin + Redukton + HCl: starke Gelbfärbung.
- c) *p*-Phenylendiamin + CuSO_4 + Persulfat: wie Reaktion 2).
- d) Anilin + CuSO_4 + Persulfat: wie Reaktion 2).
- e) Dimethyl-*p*-Phenylendiamin + CuSO_4 + Persulfat ergab *sehr langsam* Färbung: schwach rosa dann rotviolett, blauviolett, schwarz.

Diese Versuche zeigen: ein Teil (etwa 25 %) des Buttergelbs wird zu *p*-Phenylendiamin gespalten, ein anderer Teil bildet einen grünen bis blauen Farbstoff (mit Cystein Thiofarbstoff?).

Absorption (in vitro) von Buttergelb auf Rattenleberbrei

Versuche zum Nachweise von Spaltprodukten

Normale Rattenleber wurde mit 5 ml Arachidöl-Lösung von 0,5 mg Buttergelb verrieben und dann 2 Stunden bei 37° inkubiert. Das Reaktionsgemisch wurde dann mit Arachidöl extrahiert bis beim Schütteln mit der salzsauren Wasserlösung keine Buttergelb-Reaktion mehr auftrat. *Ar.*

Der ungelöste Anteil wurde dann mit Alkohol extrahiert bis sich keine Buttergelb-Reaktion mehr zeigte. *A.* Der ungelöste Anteil wurde hierauf mit 5 ml 2-n. NaOH versetzt und auf dem Wasserbad 60 Minuten hydrolysiert und schliesslich mit HCl angesäuert. *L.*

In der folgenden Tabelle ist angegeben: 1) das Ergebnis der Buttergelb-Probe. 2) Die Farbenreaktion der mit Redukton versetzten Lösung (Red. Lös.).

Versuch mit Trichloressigsäure (siehe Tabelle 3): Die Fällung wurde in 6 ml Arachidöl-Lösung (enthaltend 0,5 mg Buttergelb) aufgeschlämmt und bei 37° 2 Stunden inkubiert, hierauf mit Arachidöl gewaschen bis alles Buttergelb entfernt war. Hierauf mit Alkohol gewaschen bis die Buttergelb-Reaktion verschwunden war. Keine Absorption konnte beobachtet werden.

Tabelle 3.

Ratte	Ar.		A		L	
	Butterg.	Red. Lös	Butterg.	Red. Lös	Butterg.	Red. Lös
Normal, Geb. Febr. -51	++	—	+	—	—	—
Normal, Geb. April -51.....	++	—	+	—	—	—
Buttergelb Nr 14	++	—	+	—	—	—
Buttergelb Nr 5 Leberlappen I ..	+	—	+	—	—	(+)
» II ..	+	—	+	—	—	(+)
» III ..	+	—	+	—	—	(+)
» IV ..	+	—	+	—	—	(+)

Tabelle 4.

	B		C		Ol	
VM, geb. April -51, 3 St. nach Buttergelb-Eingabe.....	—	—	—	—	—	—
31. III. Buttergelb Leberlappen I, II, III, IV ..	—	—	—	—	—	—
Buttergelb Nr 19: Leberlappen I, II, III, IV ..	—	(+)	—	—	—	+
Buttergelb Nr 3: Statt Ausfällung mit HCl wurde Trichlor- essigs. verwendet. Ein Teil der Fällung weiter verwendet	—	—	—	—	—	—

Methode zu Tab. 4. Die Leberlappen wurden einzeln mit je 5 ml PO_4 -Puffer 6,9 extrahiert, die Emulsion zentrifugiert, die Lösung mit HCl versetzt (Lösung B).

Spalte B: (Rotfärbung, falls unverändertes Buttergelb anwesend) Zusatz von Redukton (*p*-Phenylendiamin-test).

Das Ungelöste wurde mit 5 ml 2-*n* NaOH 60 Min. auf dem Wasserbad hydrolysiert, hierauf mit HCl angesäuert (Lösung L). (Ungelöst Ol).

Spalte L: geprüft wie oben (B).

Spalte Ol: Hydrolyse mit 5 ml 4-*n* HCl bei 100° C 60 Min.

Prüfung der Lösung wie oben.

Zum Vergleich sei auf die Ergebnisse von E. und J. MILLER verwiesen.

Die Untersuchung wurde ausgeführt mit Unterstützung von *Konung Gustaf V:s Jubiläumsfond*.

Stockholm Universität, Vitamin-Institut und Institut für organ.-chem. Forschung.

Tryckt den 10 oktober 1952

Uppsala 1952. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

Enzyme-substrate compounds and activity-pH-curves of the amylases

III. pH-curves of barley β -amylase

By K. MYRBÄCK and BARBRO PERSSON

With 5 figures in the text

In the first part of this series (1) the dependence of the activity of certain amylases upon pH and substrate concentration was discussed. It was shown that in the cases investigated the electric charges of the enzyme molecules and the enzyme-substrate compounds are the rate-determining factors, enzyme concentration and temperature being kept constant. The variation of the Michaelis constant K_m with pH, found by other investigators in certain cases (2), was shown to be only apparent and caused by the fact that among the substrate-binding groups of the enzyme molecules there are certain basic groups which alter their charge in the pH-range in question. If it be assumed that these basic groups lose their ability to combine with the substrate on transformation into the charged (possibly ammonium) form, then K_m is found to be independent of pH (3).

In part II of this series of investigations (4) it was shown that, just as in the case of saccharase (5) and urease (3), the alkaline branch of the activity-pH-curve of a mold amylase is independent of the substrate concentration whereas the acid branch is displaced toward the acid side with increasing substrate concentration. Corresponding experiments with barley β -amylase will be reported in the following.

The enzyme was a partly purified β -amylase from a cold water extract of six-row barley, free from α -amylase. The enzyme was stored as a dry powder obtained by precipitation with tannin and washing with acetone. A preparation of soluble Lintner starch was used as the substrate. This was necessary in order to obtain sufficiently concentrated substrate solutions which could be handled without difficulties in the sugar determinations. The saccharification was determined according to the Willstätter and Schudel method. Six to ten sugar determinations were made in each experiment and the reduction values were calculated as g glucose in 100 ml assay mixture.

Evidently it is necessary in experiments of this kind to make sure that the enzyme is so stable at all acidities in question that no irreversible inactivation takes place during the experiments (Table 1).

It appears from Table 1 that the saccharification proceeds, at all acidities in the pH-region investigated, to a degree of hydrolysis amounting to 25–30 per cent, *i.e.* to a normal yield of maltose of 50–60 per cent. The lowest values are obtained in the most acid solutions and obviously a slight inactivation of the enzyme occurs for instance at pH = 3. However, this inactivation is so slow that it can play no role during the

Table 1

Increase of reducing power, calculated as g glucose in 100 ml.

Reaction time	5.00 g starch in 100 ml				
	pH = 3.19	pH = 3.97	pH = 5.63	pH = 8.55	pH = 9.10
10 min.	0.026	0.071	—	—	—
20 »	0.047	0.155	0.167	0.044	0.022
30 »	0.095	0.222	0.227	—	0.040
40 »	0.133	0.301	0.315	0.137	0.055
50 »	0.159	0.349	0.377	0.151	—
60 »	0.194	0.376	0.429	0.167	—
70 »	0.222	0.438	0.486	—	0.094
2 days	0.64	—	1.55	—	0.505
3 »	—	1.33	—	—	—
4 »	—	1.36	—	1.15	—
5 »	1.20	1.36	—	—	—
6 »	—	—	—	—	1.35
8 »	—	—	1.56	1.56	—
	0.25 g starch in 100 ml				
	pH = 3.04	pH = 7.01	pH = 8.47	pH = 8.80	
10 min.	0.002	0.018	—	0.001	
20 »	0.005	0.032	0.012	—	
30 »	—	0.043	0.017	—	
40 »	0.009	0.049	0.022	—	
50 »	—	0.051	0.025	—	
60 »	—	0.053	0.028	0.010	
24 hrs	0.069	0.070	0.067	0.070	

first hours of hydrolysis. Therefore it is possible to determine a true value of the reaction rate from the slope of the curves in Fig. 1. In most cases these curves are practically straight lines. Only in the most diluted substrate solutions they are sometimes, for obvious reasons, slightly bent. In such cases the initial velocity is taken from the tangent of the curve (dotted line in Fig. 1 B).

Series of experiments were carried out at three different substrate concentrations. The initial velocities, expressed as mg of glucose per minute, are collected in Table 2. It appears that the alkaline branches of the curves have the form of dissociation curves. Actually the curves drawn in Fig. 2 are, between pH = 5 and 9, the theoretical dissociation curves of a weak acid having $K_a = 10^{-8}$, and the experimental values obviously agree well with these curves. This means, *i.e.*, that in the alkaline region the activity-pH-curves are independent of the substrate concentration. In contrast to this we find that the acid branch of the pH-curve is displaced toward the acid side when the substrate concentration is increased. Qualitatively this is quite in agreement with the conditions found in the case of saccharase, urease and mold amylase. A quantitative treatment, however, is not as simple as, for instance, in the case of saccharase, partly because of the nature of the substrate, partly because the acid branch of the pH-curves of the β -amylase investigated has not the form of a simple dissociation curve (see below).

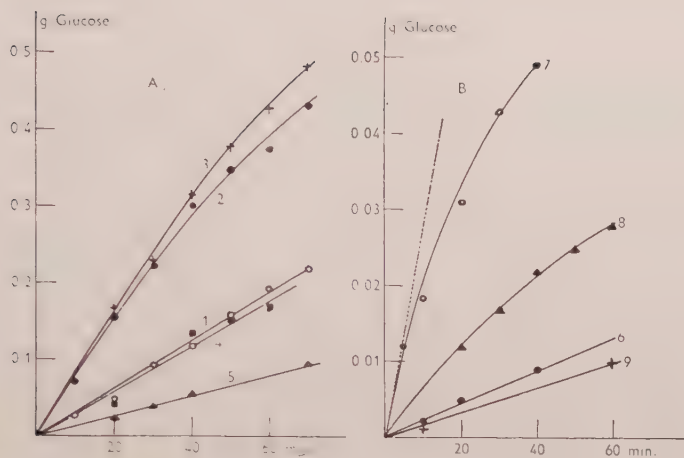


Fig. 1 A. Increase of reducing power in 5 percent starch solution: 1) pH = 3.19, 2) pH = 3.97, 3) pH = 5.63, 4) pH = 8.55, 5) pH = 9.10.

Fig. 1 B. Increase of reducing power in 0.25 percent starch solution: 6) pH = 3.04, 7) pH = 7.01, 8) pH = 8.47, 9) pH = 8.80.

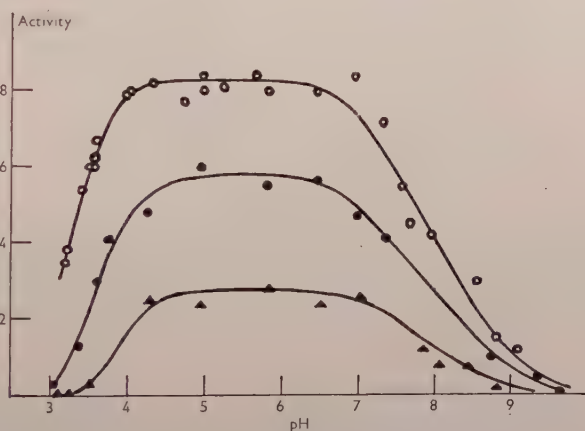


Fig. 2. Activity-pH-curves of barley β -amylase; substrate concentrations 5, 1, and 0.25 percent.

The affinity enzyme-substrate can be calculated from the curves of Fig. 2 in the pH-range to the alkaline side of pH = 5. If the substrate concentration $[S]$ is expressed as percent soluble starch, the figures of Table 3 can be used. The initial reaction velocity, v , is expressed as in Table 2.

The value of $1/v_{\max}$ for $[S] = \infty$ is found by extrapolation, according to LINEWEAVER and BURK (6) (Fig. 3), to be 0.107 and K_m is calculated to be 0.59 ($[S]$ as percent starch).

In the following calculations the value $v/v_{\max}$, the "relative activity," has been used as a true expression of the enzyme activity in its dependence on pH and sub-

Table 2
Enzyme activity at different substrate concentrations.

5 % starch				1 % starch		0.25 % starch	
pH	activity	pH	activity	pH	activity	pH	activity
3.19	3.5	5.22	8.1	3.07	< 0.5	3.08	~ 0
3.23	3.8	5.63	8.4	3.36	1.3	3.24	< 0.2
3.40	5.4	5.80	8.0	3.60	3.0	3.52	0.3
3.49	6.0	6.44	8.0	3.75	4.1	4.28	2.5
3.51	6.0	6.93	8.4	4.26	4.8	4.95	2.4
3.55	6.2	7.32	7.2	4.96	6.0	5.82	2.8
3.57	6.7	7.54	5.5	5.81	5.5	5.82	2.8
3.97	7.0	7.62	4.5	6.47	5.6	6.52	2.4
4.02	8.0	7.96	4.2	6.97	4.7	7.01	2.6
4.31	8.2	8.55	3.0	7.35	4.1	7.85	1.2
4.71	7.7	8.81	1.5	8.75	1.0	8.03	0.8
4.96	8.4	9.10	1.2	9.67	~ 0	8.47	0.7
4.96	8.0					8.80	< 0.2

Table 3

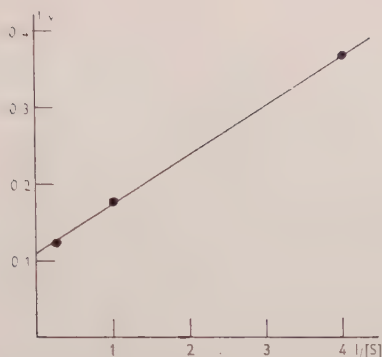
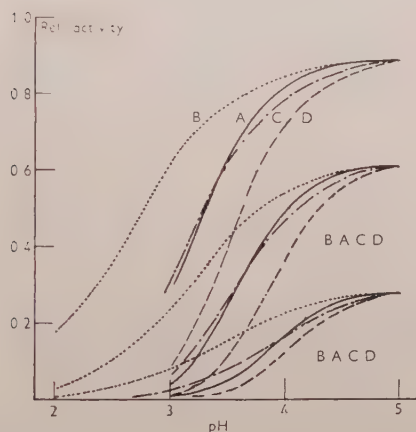
1/[S]	1/v
4	0.370
1	0.176
0.25	0.121
(0)	(0.107)

strate concentration. As was pointed out above, our experiments show that the alkaline branch of the pH-curve is independent of the substrate concentration and coincides practically with the dissociation curve of a weakly acidic group having $K_a = 10^{-8}$. The acid branch of the pH-curve, however, obviously has not the same form; the experimental curves are considerably steeper, *i.e.* the activity decreases more rapidly with increasing acidity than would be expected if the acid branch of the pH-curve were simply the dissociation curve of a weakly basic group. This can easily be seen from Fig. 4 where the experiments are represented by (solid) curves, denoted as curves A, and the theoretical dissociation curves (dotted) are denoted as curves B. These curves B are calculated in the following way. The enzyme is supposed to be an ampholyte, schematically represented by the formula HENH_2 . The dissociation of the acidic group ($[\text{HENH}_2] \rightleftharpoons [\text{H}^+] + [\text{ENH}_2^-]$; dissociation constant $K_a = 10^{-8}$) is negligible in the acid region. The uncharged basic group of the enzyme mediates the attachment of the substrate

$$[\text{HENH}_2] \cdot [\text{S}] = K_m \cdot [\text{HENH}_2\text{S}].$$

The transformation, in acid solution, of the basic group into the corresponding ion is governed by the formula

$$[\text{HENH}_2] \cdot [\text{H}^+] = K_B \cdot [\text{HENH}_3^+].$$


 Fig. 3. Graphical determination of $1/v_{\max}$ and K_m .

 Fig. 4. Solid curves A are the pH-curves found in the experiments. Curves B, C, and D are calculated from $K_m = 0.59$ and $K_B = 2.5 \times 10^{-4}$; curves B from formula (1), curves C from formula (3), and curves D from formula (4), $n = 3$.

Disregarding the dissociation of the acidic group we find that the relative activity of the enzyme at a certain hydrogen activity (concentration) $[H^+]$ and the substrate concentration $[S]$ is

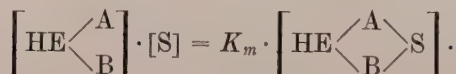
$$(1) \quad \frac{[HENH_2S]}{\Sigma} = \frac{1}{1 + \frac{K_m}{[S]} \left(1 + \frac{[H^+]}{K_B} \right)}$$

where Σ is the total enzyme concentration, proportional to $v_{\max}$.

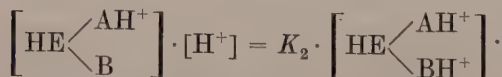
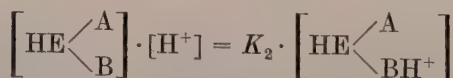
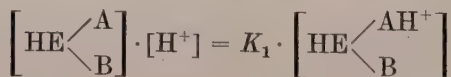
The discrepancy between the curves calculated from this formula and the experimental curves has to be explained. As pointed out before, a simple explanation would be that, in acid solution, the enzyme is irreversibly inactivated so rapidly that the velocities found are not really those which would correspond to the original

enzyme concentration. However, this explanation can not possibly be correct since, even in the most acid solutions investigated, the increase of the reducing power was found to be, for a considerable part of the reaction, proportional to the reaction time (Fig. 1), showing that no measurable inactivation interferes with the determination of the initial velocity. Thus it seems unavoidable to assume that the pH-curves found are the real activity-pH-curves unaffected by secondary phenomena. The question then arises, if the found discrepancy between theory and experiment disproves the theory of the acid branches of the activity-pH-curves as dissociation curves of basic, substrate-binding groups of the enzyme molecules. It has been assumed hitherto that the acid branch of the pH-curve of a certain enzyme is the dissociation curve of *one* basic group which, in its uncharged form, combines with the substrate. However, as is well known, it seems necessary in many cases to assume that several groups in a specific geometrical orientation on the enzyme surface ("binding area") are involved in the binding of the substrates (7). It seems rather probable that in the binding of glycosides, oligo- and polysaccharides to the corresponding enzymes more than one basic group is involved (8). If the assumption made previously of the substrate-binding capacity of only the uncharged form of one basic group is extended to all, or in any case more than one, substrate-binding basic group, the form of the activity-pH-curve may be modified considerably, depending upon the relative magnitude of the dissociation constants of the substrate-binding groups.

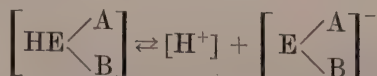
Let us assume that $\text{HE} \begin{smallmatrix} \text{A} \\ \text{B} \end{smallmatrix}$ is an enzyme where A and B are substrate-binding, basic groups, both groups being necessary for the binding of one substrate molecule. Thus, in the presence of substrate, we have the equilibrium



Besides, in acid solution, we have the equilibria



Disregarding the dissociation of the acidic group



which is supposed to be negligible in acid solution, we find that the concentration of the enzyme-substrate compound, *i.e.* the relative activity of the enzyme at a certain hydrogen concentration $[\text{H}^+]$ and the substrate concentration $[\text{S}]$ is

$$(2) \quad \frac{\left[\text{HE} \begin{array}{c} \text{A} \\ \text{B} \end{array} \text{S} \right]}{\Sigma} = \frac{1}{1 + \frac{K_m}{[S]} \left(1 + \frac{[H^+]}{K_1} + \frac{[H^+]}{K_2} + \frac{[H^+]^2}{K_1 \cdot K_2} \right)}$$

If K_2 is large compared to K_1 the formula reduces to the one (formula 1) calculated on the assumption of only one substrate-binding, basic group. In this case the activity-pH-curve will have practically the normal form and correspond to the dissociation curve of group A. However, if K_2 has about the same magnitude as K_1 the curve will be more or less displaced. If $K_2 = K_1 = K_B$ the formula reduces to

$$(3) \quad \frac{\left[\text{HE} \begin{array}{c} \text{A} \\ \text{B} \end{array} \text{S} \right]}{\Sigma} = \frac{1}{1 + \frac{K_m}{[S]} \left(1 + \frac{[H^+]}{K_B} \right)^2}$$

If it be assumed that n substrate-binding basic groups in the enzyme molecule have the same dissociation constant K_B , it is easily seen that the general formula has the form

$$(4) \quad \frac{\left[\text{HE} \begin{array}{c} \text{A} \\ \text{B} \end{array} \text{S} \right]}{\Sigma} = \frac{1}{1 + \frac{K_m}{[S]} \left(1 + \frac{[H^+]}{K_B} \right)^n}$$

We have tried to find out if the pH-curves of the β -amylase in the acid region can be explained satisfactorily by application of a formula of this type, *i.e.* on the assumption that more than one basic group with the same or nearly the same K -value is involved in the binding of the substrate. In our calculations we have used the value $K_m = 0.59$, found in the above experiments. It can be seen from the activity-pH-curves that K_B should have a value in the neighbourhood of 10^{-4} . If we use the value $K_B = 2.5 \times 10^{-4}$ and calculate the theoretical curves from formula (1) we arrive at the dotted curves B in Fig. 4, valid for the substrate concentrations 5, 1, and 0.25 per cent. Obviously the experimentally determined curves A of Fig. 4 deviate strongly from curves B. We have then calculated, according to formula (3), a second set of curves (curves C, dashes and dots, in Fig. 4), assuming that two basic groups with $K_B = 2.5 \times 10^{-4}$ are involved. These curves agree moderately well with the experiments. However, it seems that the slopes of the curves C are not quite the same as those of the curves A. A third set of curves was then calculated from formula 4, assuming that $n = 3$ (curves D in Fig. 4; dashes). It seems that these curves run approximately parallel to the experimental curves. Therefore, if a somewhat different value is chosen for K_B a good agreement should be obtained. The curves of Fig. 5 were calculated on the assumption that $K_B = 5 \times 10^{-4}$. The dotted curves B are calculated from formula (1), the curves C from formula (3). Both sets of curves (B and C) appear to deviate appreciably from the experiments. However, values of the relative activity, calculated from formula (4) and $n = 3$ (curves D), agree well with the values found in this investigation (circles in Fig. 5).

Of course, our determinations are not accurate enough to allow us to determine, for instance, if the values of K_B and n used here are correct or not. The calculations

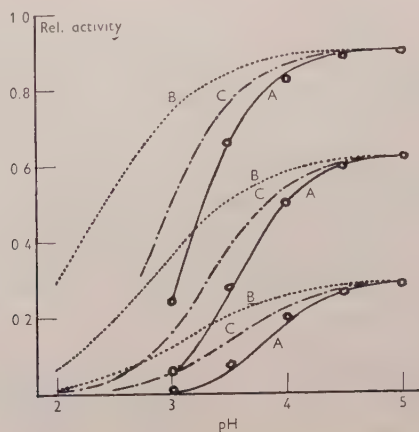


Fig. 5. Curves calculated from $K_m = 0.59$ and $K_B = 5 \times 10^{-4}$; curves B from formula (1), curves C from formula (3), and curves D from formula (4), $n = 3$. Experimental values are represented by circles.

were carried out to show that the form of an activity-pH-curve of an enzyme may deviate strongly from that of a simple dissociation curve and, nevertheless, be explained on the basis of an extension of the original Michaelis theory for the saccharase activity-pH-curve. Needless to say, the pH-curves of enzymes may be distorted from the ideal shape on other grounds than those discussed here. Secondary effects, as the irreversible inactivation of enzymes at certain acidities may, of course, play a role and, apart from this, the nature of the substrate and of activating or inhibiting agents may influence the activity curves.

SUMMARY

The activity-pH-curves of barley β -amylase have been determined at three different substrate concentrations. The alkaline branch of the curves has the form of a simple dissociation curve of an acidic group of the enzyme molecule. This part of the pH-curves is independent of the substrate concentration, intimating that the acidic group has nothing to do with the binding of the substrate. The acid branch of the pH-curve is displaced toward the acid side with increasing substrate concentration, showing that basic groups are involved in the enzyme-substrate combination. The pH-curves in the acid region deviate strongly from the simple dissociation curve of a basic group of the enzyme. It is shown that when two or more uncharged basic groups, having K_B -values not too far apart, are necessary for the binding of one substrate molecule, the form of the activity-pH-curve in the acid region can be understood.

REFERENCES: 1) Myrbäck, K., *Arkiv Kemi* 3, 437 (1951). — 2) van Slyke, D. D., *Advances in Enzymol.*, 2, 33 (1942). — 3) Myrbäck, K., *Acta Chem. Scand.* 1, 142 (1947). — 4) Myrbäck, K. and Willstaedt, E., *Arkiv Kemi* 3, 443 (1951). — 5) Myrbäck, K., *Z. physiol. Chem.* 158, 160 (1926). — 6) Lineweaver, H. and Burk, D., *J. Am. Chem. Soc.* 56, 658 (1934). — 7) Helferich, B. in Sumner, J. B. and Myrbäck, K., *The Enzymes*. Academic Press, New York (1950), Vol. I, p. 79. — 8) Myrbäck, K., *Arkiv Kemi* 2, 417 (1950).

Institute for Organic Chemistry and Biochemistry, University, Stockholm.

Tryckt den 29 september 1952

Uppsala 1952. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

Continuous zone electrophoresis by crossed velocity fields in a glass powder column

The arrangement of a constant liquid flow and description of a simple pump apparatus

By INGER BRATTSTEN

With 4 figures in the text

Introduction

Successful electrophoretic separation of substances of different mobilities requires control of the spontaneous processes within the liquid which cause remixing. Fundamentally, these processes are of two different kinds. Either the transport is specifically related to the properties of the displaced substances, or it involves a non-specific exchange of material. Migration disturbances in the boundaries due to the accompanying conductivity gradients and diffusion belong to the former type of processes; transport by turbulence, convection and circulation currents to the latter. The arrangement of a constant transfer of liquid in the continuous-working methods necessitates a simultaneous consideration of the same processes. The treatment of these problems, and in particular the convection effect, has considerably influenced the development of the electrophoretic methods. Some steps of special importance to the technique dealt with in this paper will be briefly re-collected.¹

Methods of controlling the convection effect. During electrophoresis density gradients develop due to the electric and thermal transference effected by the current. If a density gradient in the liquid is unstable in the gravitational field, it is in general accompanied by a velocity gradient which tends to eliminate the instability by mass transport. The convection transport can be impeded by regulation of the resistance to flow. Both the pressure resistance and that due to the frictional force have been used as the stabilizing principle. As a special alternative the controlled convection transport has been employed for increasing the efficiency of the separation. This method is based on the electrodecantation phenomenon first described by PAULI and coworkers (2).

¹ A full account of the questions which concern preparative electrophoresis, including a fairly complete list of references up to 1948, can be found in an article by SVENSSON (1).

In a free solution the stability is mainly determined by the pressure resistance to flow, and a positive density gradient must be maintained for avoiding convection effects. In the moving boundary method of analyzing protein mixtures this condition is fulfilled by adequate restriction of the migration of the substances to be separated (TISELIUS, 3, 4). Although originally developed for analytical purposes, TISELIUS' method has found many applications in preparation work. It was brought to a high degree of perfection by SVENSSON, who constructed a semicontinuous-working apparatus on the boundary principle (5). But even with this apparatus the preparation of pure proteins in appreciable quantities turned out to be a very laborious task. The drawbacks were mainly inherent in the method of stabilizing against convection by incomplete separation of the protein components. For instance, a component of intermediate mobility could only be obtained in a pure state by repeated fractionations of the material, and in a yield considerably lower than the theoretical one. However, complete and simultaneous fractionation of a mixture can be performed in free solution if a superimposed positive density gradient is used for stabilizing the liquid. This possibility was devised by PHILPOT (6). The positive density increments can be obtained by the addition of suitable non-electrolytes, *e.g.* alcohols, to the electrolyte medium.

The velocity gradients in a liquid can also be depressed by the insertion of a capillary system, which sufficiently increases the frictional resistance to flow. This method of eliminating the convection transport in electrophoresis was introduced by LODGE (7) and has later been applied by many workers. As a preliminary to the method dealt with in this paper some experiments by SVENSSON may be mentioned.¹ He modified his earlier apparatus for preparative electrophoresis in free solution in order to perform the fractionation in a sand column. A certain quantity of serum was injected through the bottom capillary of the U-tube and brought to separation by the electric current. Simultaneously, the liquid in the apparatus was given a slow motion by "compensation" in order to keep the protein material within the sand column. After the separation, the liquid in the cell was slowly pressed out through the top capillaries of the cuvette and a new lot of serum introduced from the bottom. The outflowing liquid, which contained the protein components distributed according to their mobilities, was fractionated, and the identity and purity of representative fractions was established by ordinary electrophoretic analyses. Hence the possibility of complete electrophoretic separation of serum proteins in a single operation was evidenced by these experiments.

Continuous-working methods. When the convection effect is controlled, the electrophoretic procedure can be modified for a continuous operation by the arrangement of a continuous supply of the mixture and withdrawal of fractionated material. Different ways of conducting the fractionation process are possible depending upon the mutual arrangement of the electric and liquid flow fields.

In the countercurrent electromigration method the hydrodynamic and electric velocity fields are parallel and opposite in direction. This method was developed by BREWER, MADORSKY, and coworkers for the separation of certain isotope ions (8, 9). They use glass beads or a similar material as the stabilizing agent. In the method of electrophoresis-convection developed by KIRKWOOD, CANN, and coworkers the purification of a protein is effected by means of a vertical convection current in a horizontal electric field (10). The process takes place in a vertical capillary channel connected to two reservoirs which contain the liquid. The electro-

¹ SVENSSON, H., unpublished, Uppsala (1946-47).

phoretically fastest protein is enriched in the lower vessel. Both these methods are best suited for the isolation of single components of a solution.

If a homogeneous liquid flow is applied in a direction perpendicular to the electric field, the components are spread out as inclined bands in the cell, and it is possible to isolate all components simultaneously. The angle of inclination of a substance band is determined by the ratio of the volume velocities of this component in the electric and the liquid flow fields (11). This method was invented by PHILPOT and applied in an apparatus for continuous electrophoretic separation in thin liquid layers using high current densities (6). As the stabilizing density gradient was established by a number of flowing liquid layers of downwards increasing density, the direction of the liquid flow field must in this case be horizontal and that of the electric field vertical. Continuous zone electrophoresis by crossed velocity fields in a capillary system was first considered by SVENSSON and JANSSEN¹. This method has been investigated independently by JANSSEN², SVENSSON and BRATTSTEN (11), and GRASSMANN and HANNIG (12)³. Due to the stabilizing mechanism we are here fundamentally independent of gravity. In practice horizontal electric and vertical liquid flow fields possess some advantages.

The proper functioning of a continuous-working method involves the simultaneous control of both the velocity processes, whereas in a batch method, *e.g.* that used by SVENSSON, the electric migration and the transport in the liquid flow field are basically separated in time. It is evident that a much higher constructional and operative precision is required in the former case than in the latter. As stated by PHILPOT (6), the relative simplicity of an apparatus on the batch principle and its ease in handling, requiring a minimum of supervision during the electric transfer, are important factors. However, if a continuous-working apparatus can be operated to a great extent automatically, its superiority in preparative work on a large scale basis is unquestionable.

The introductory work on continuous zone electrophoresis by crossed velocity fields in glass powder gave quite promising results. A number of difficulties were encountered, but these were in general of a kind that should be overcome. In this laboratory the subsequent work has been mainly concerned with the improvement of the glass powder technique (*cf.* ref. 11). The apparatus is dimensioned according to laboratory requirements with the fractionation of blood serum as a standard operation. This protein mixture is suitable for the purpose because the mobilities of the components are known quantities, some of which differ by less than one mobility unit at zero degree. Besides, the preparation of pure serum proteins is by itself a matter of great importance.

The efficiency of the separation is fully utilized only if the continuous processes are adequately coordinated, so that the angles of the bands do not change during the course of the fractionation. The arrangement of the liquid flow process is treated in this report. This subject comprises the achievement of a constant velocity throughout the column, time constancy, and the selection of a suitable

¹ SVENSSON, H. and JANSSEN, L. W., private discussion. Copenhagen (1946).

² JANSSEN, L. W., unpublished. Amsterdam.

³ Separation experiments in filter paper according to this method have recently been reported by GRASSMANN and HANNIG (13), BRATTSTEN and NILSSON (14), and DURRUM (15). A similar procedure, obtained by combining the methods of partition chromatography and electrophoresis, has been described by HAUGAARD and KRONER (16). These articles are not concerned with the constancy of the velocity processes, however.

velocity range with regard to the experimental requirements. The time constancy of the velocity will be treated separately, however. For the arrangement of a constant liquid flow knowledge of the factors which influence the capillary flow and the properties and functioning of the capillary system is essential. The flow conditions are closely related to those regulating the processes of backmixing in the cell, especially the convection effect and diffusion. As a complete description of the apparatus will be given separately, only such details are mentioned which concern the flow problem.

The capillary flow

The interstices in the glass powder form a branched pore system of capillary dimensions where the liquid is transported. In the liquid layer adhering to the wall the velocity is zero but increases towards the centre of each pore. In general, liquid movement is laminar or turbulent. The variables which govern the flow process are suitably introduced by REYNOLD's number, R :

$$R = \frac{\sigma v a}{\eta}$$

σ = the density of the streaming liquid

v = the velocity of the streaming liquid

η = the coefficient of viscosity of the streaming liquid

a = a characteristic length, suitably the pore width.

The numerical value of the dimensionsless quantity R is characteristic of the state of flow. If two geometrically similar cases of liquid boundaries are compared, the states of flow are similar if REYNOLD's number has the same value in both cases, irrespective of the values of the individual variables in the formula.

According to PRANDTL, REYNOLD's number may be regarded as the ratio between the forces of inertia and friction, which at a certain velocity are in equilibrium with the driving pressure (17). In agreement with this interpretation high values of REYNOLD's number indicate high forces of inertia relative to the internal friction and a turbulent streaming of the liquid, and low values indicate predominance of the frictional forces and a laminar type of flow. In the latter case the movement is essentially governed by the viscosity law. In a capillary of circular cross-section laminar movement takes place according to POISEUILLE's equation:

$$V = \frac{\pi p r^4}{8 l \eta}$$

V = the volume velocity of the fluid

p = the liquid pressure difference between the level of inflow and outflow

r = the radius of the capillary

l = the length of the capillary.

In aqueous electrolyte solutions of the kind used in electrophoresis the density and the coefficient of viscosity are low and of the same order of magnitude (about 1 in the C G S system, with a variation of a few per cent). Therefore, the value of REYNOLD's number, and hence the state of flow, is mainly determined by the ve-

locity and the pore characteristics. In smooth capillaries the flow is in most instances laminar. However, the critical value of REYNOLD's number which indicates the transition between the two main types of flow is lowered by roughness of the wall, non-constancy of the cross-section and eddies in the entering liquid. In the irregular paths of a glass powder column the geometry is very favourable for the origin of eddies, and, except when powders of very fine sizes are used, it seems reasonable to expect some degree of turbulence in the separation column.

If the flow is laminar diffusion and related processes take place in the same way as in a stationary liquid. If it is instead turbulent the exchange reactions in the liquid are governed by a law formally similar to the viscosity law, but the numerical value of the constant is always higher. SCHMIDT has shown that in this case the constant has the same value whichever of the possible exchange reactions is concerned, that is, exchange of mechanical, chemical and thermal energy, *etc.* (18). The turbulence therefore gives rise to an apparently increased viscosity, and ditto chemical and thermal diffusion. The velocity profile in a capillary, which is parabolic in the POISEUILLE streaming, is more or less flattened out by the action of eddies, and simultaneously the direct proportionality between the pressure and velocity given by POISEUILLE's equation disappears, and the increase of the velocity becomes slower.

Although the apparatus was not equipped for such measurements, an attempt was made to establish the relationship between the pressure and the velocity. Within the experimental range of velocities and pore systems the velocity in each column was approximately proportional to the applied pressure, indicating an essentially laminar type of flow. Excessively high velocities and coarse packings were not used in these experiments. The measurements do not prove the absence of eddies in the systems investigated, but the results justify a qualitative treatment of the flow problem on the basis of laminar streaming. In this connection it may be observed that POISEUILLE's equation has been reported not to be strictly valid in the case of colloid solutions (19).

The flow conditions in the column

In the separation column, the velocity should be constant in the whole system and the equilibrium reactions, which involve the effect of the side-channeling, should be adjusted to fulfil this condition. Because of the side-channeling individual tubes can hardly be distinguished and heterogeneities in the capillary paths are not confined to a local effect but influence the flow conditions also in adjacent parts of the column.

Several factors give rise to flow disturbances. The radial variation of the velocity in each channel cannot be avoided. Of the factors which define the capillary streaming the radius and length of the pore characterize the path, and the coefficient of viscosity and the density the flowing liquid. A change of one of these variables shifts the pressure-velocity equilibrium in the flowing liquid. In the twisted and branched pore system, the spacings and directions of the capillary paths necessarily vary. In the liquid, density and viscosity gradients are present in the boundaries of the substance bands and accompany the temperature gradients due to the JOULE heating. Superimposed upon the temperature gradients from the centres to the walls of the channels, there is a gradient from the middle of the column to the walls of the cuvette, which are cooled by circulating water of 0° C.

The pressure-velocity equilibrium is influenced by the electroosmotic effect. An additional pressure disturbance is due to the unequal resistance in the inlet and outlet channels.

It is evident that a laminar flow of constant strength and direction can never be strictly realized in the column. But in practice we are less concerned with the capillary velocity than with the average velocity per unit cross-section of the column (volume velocity). In the first place, each substance band is extended over a great many pore channels. In the second place, one exit tube collects the liquid from a considerable number of capillaries. It should be stressed that the apparatus is the frame of reference in the measurement of these average velocities, whereas it is the walls of the channels when the capillary velocities are concerned. The variation of the capillary velocity essentially manifests itself in a certain blurring of the zone boundaries. The broader the substance bands the less important is the effect of the capillary changes of the velocity. In practice it is therefore sufficient to achieve constancy of the average velocity and regulate the variation of the capillary velocity so that the resulting boundary spreading is negligible compared to the total band breadth.

On these presumptions the arrangement of a constant velocity involves the following questions.

1. *Elimination of unnecessary heterogeneities.*
2. *Elimination of the velocity gradients in the concentration boundaries by adjustment of the frictional resistance to flow (i.e. selection of the grain size of the packing and the velocity).*
3. *Differentiation of the hydrostatic pressure.*

1. Elimination of unnecessary heterogeneities. Such heterogeneities are due to excessive heating and non-uniformity of the capillary resistance in the packing and in the transport channels of the liquid outside the packing.

Heat control. Excessive heating is avoided if the cooling system is operatively efficient and the necessary potential gradient established without the production of too much heat. The general procedure for the elimination of the temperature gradients in the cell has been outlined by TISELIUS (3). However, the conditions for the extraction of heat are relatively unfavourable when the cuvette is made in perspex. Compared to glass, the thermal conductivity and the resistance to mechanical deformation are low in the plast material. Due to the latter property of the material the walls of the cuvette must be fairly thick in order to ascertain firmness, which hampers the extraction of heat. The thermal conductivity of the packing is another factor of importance. From this point of view powdered glass is superior to a material such as perspex beads, even if the latter particles are perfectly spherical. The temperature rise in the cell during electrophoresis is followed by means of a thermo-element inserted in the glass powder.

Homogeneity of the packing. The importance of the size and shape of the powder particles is evident from the fact that the fourth power of the pore radius enters POISEUILLE's equation. A closepacking of spheres would of course give the best homogeneity of the pore system. Since glass beads were not available when this investigation was carried out, glass powder of uniform size has been used. A photomicrograph of the powder is shown in Fig. 1. Although the shapes of the particles deviate from the spherical one, this powder is easy to pack and



Fig. 1. Microphotograph of the glass powder. Magnification 88:1.

gives apparently homogeneous columns. The packing is performed by adding the powder to the water in the cuvette and allowing it to settle. The final packing takes place while the liquid is flowing and is practically complete in a couple of days. The fractionation of the powder is performed by sifting.

The homogeneity of the packing can be tested by running "colour bands" in different parts of the column. If a coloured substance, for instance an indicator dye, travels in the liquid flow field as straight and vertical bands, it is assumed that the average resistance is fairly uniform, whereas deviations from the straight-lined course may indicate the presence of velocity gradients due to heterogeneities in the packing.

The amount of liquid mixing caused by the variation of the capillary velocity can be estimated from the blurring of the colour bands when a very dilute dye solution is used and the diffusion spreading reduced as far as possible. In the finest packings investigated the boundaries of a colour band appeared with the sharpness of a discontinuity, and within the experimental limits this state was remarkably independent of changes of the velocity. The almost infinite sharpness disappeared as soon as a coarser powder was used. A broadening of a band by some hundred per cent could be observed in the coarse powders. But even in the coarsest packings used, the broadening of the boundaries was but slight when relatively high velocities were used. To a great extent the spreading effect is probably due to diffusion. As in the case of the velocity we here have to distinguish between the diffusion relative to the capillary path where the reaction takes place, and that relative to the apparatus. It is evident that the latter quantity is lowered by the insertion of a capillary system, and more the finer the packing. With regard to the spreading effect of

the variation of the capillary velocity in coarse packings the results with high velocities were taken as conclusive.

Homogeneous flow conditions outside the packing. In preliminary work difficulties were encountered in removing heterogeneities in the base support for the glass powder and in the exit tubes. In the latter, capillary resistances and surface tension differences in the level of outflow caused disturbances of the velocity. These were of course more pronounced in coarse than in fine packings. The heterogeneities can be approximately removed by making the tubes fairly wide, with smooth inner walls and regular openings. In the present apparatus the tubes have an inner diameter of 1.2 mm. Pyrex wool or sintered glass powder plates make a good support for the packing. In experimental arrangements where the glass powder column is open to the atmospheric pressure by the leads for the liquid, the free surfaces are comparatively wide, and the liquid is allowed to ascend from the bottom into tubes of 1.5–2.0 cm inner diameter. A smooth distribution of the velocity in flow experiments with colour bands as a check of the packing is a proof that these disturbances are unimportant.

In conclusion, the experimental results give evidence that the thermal disturbances of the liquid flow field and the heterogeneities in the resistance to flow can be satisfactorily depressed. When a fluid is transported under a constant pressure head the average velocity is approximately constant in the present apparatus. The degree of liquid mixing due to capillary deviations from the average conditions is considered negligible with regard to the standard requirements.

2. Selection of the grain size of the packing and the velocity range.

Although the density and viscosity increments which accompany the concentration heterogeneities in the flow field do not radically change the state of flow, they generally cause minor velocity shifts in the boundaries. If the applied pressure is constant, the velocity in a concentration boundary remains constant only in the case that the effects of the density and viscosity gradients cancel. In practice the conditions are less rigid, however. It is sufficient that the degree of remixing caused by the velocity gradients in the concentration boundaries is negligible relative to the separation desired. Hence there is a considerable margin, and a sufficiently constant velocity can be established under various conditions of flow.

The interrelation of the flow factors is especially plain in the transition range of systems of low frictional resistance where stabilization of the flow field with regard to a certain concentration gradient is barely reached. Some qualitative results of the stabilization studies are discussed in this section.

The least resistance which gives stabilization defines the upper limit of the porosity of the capillary system. The lower limit is put by the maximum resistance to flow consistent with the maintenance of a certain constant velocity. Within this range the final choice of working conditions requires the consideration of various other factors which may interfere with the liquid flow process or the separation procedure in general. This question will be discussed briefly in connection with the results of the experimental work so far performed.

Finally, the characteristics of the system used in the present apparatus are reported.

The effect of concentration gradients in the liquid flow field. The influence of concentration gradients on the flow equilibrium was studied by the technique of running colour bands through the column. In this case the bands contained coloured material, proteins and low-molecular ions, in concentrations suitable in electrophoretic separations.

The flow disturbances due to the presence of a coloured substance can be inferred from the directly observed deformation of a band where this substance is present. When the frictional resistance is low the deformation always results in a spreading of the band. In electrophoretic experiments where the protein concentration just exceeds that corresponding to the stabilizing capacity of the system the band-like shape is generally retained, but instead of traversing the column like a tight rope the band forms a curve as if it yielded to its own weight.

The observed spreading of the boundaries involves the action of various other processes of mass transport in addition to that due to convection. The electric field is the cause of part of the blurring. Care must be taken in the electrophoresis experiments to use as homogeneous substances as possible, and to keep the production of heat low. The total effect of non-uniform electric migration velocity of the coloured substance, boundary anomalies, and heat convection can be estimated by comparison of the bands in experiments with and without electric transfer. Since diffusion varies in much the same way as convection with regard to the porosity of the packing and the velocity, these two effects are more difficult to distinguish. However, if the protein concentration is varied, under constant flow conditions in all other respects, through the critical range where stabilization occurs the convection effect varies, but generally less so the diffusion spreading of the zone boundaries. With some experience conclusions can be obtained from such experiments, which allow qualitative estimates of the deformation caused by convection alone. This in turn is a measure of the velocity disturbances which accompany the concentration gradients in the liquid flow field.

The experiments, which were all performed with the same cuvette, gave the following general results:

1. At a constant low rate of flow the degree of stabilization of one and the same concentration gradient was higher the finer the packing.
2. In a system where a certain concentration gradient was but relatively stable, the stability could be improved by increasing the rate of the transfer.
3. The stabilizing power of the system must be greater the greater the absolute concentration increment of a certain substance.
4. The protein gradients were all decidedly more stable than salt gradients of the same magnitude per weight.

This behaviour can be expected from considerations of the velocity gradient in a concentration boundary as the representative of the flow disturbances. If the electric field is uniform but hydrodynamic velocity gradients are present in the concentration boundaries, the resulting direction of the migration would be different in the centre of the band and in its boundaries, which would *in se* cause a certain degree of blurring of the one boundary and sharpening of the other. Due to the presence of circulation streamings in the liquid, whereby the volume balance is maintained, the observed effect is in general a diffuse spreading, however. As already stated, the practical requirement with regard to the constancy of the velocity is that the deformation of the bands should be sufficiently low. This condition

implies that the distance covered by the boundary region should only be a small part of that of the total breadth of the band. If a constant electric displacement is assumed and the remaining sources of remixing are disregarded, it is evident that the distance covered by the boundary region in the level of outflow depends on the magnitude of the velocity gradient and the time of transfer through the column. Both these variables should have reasonably low values, and the time in the flow field must be shorter the greater the velocity gradient.

These relationships can be followed somewhat further. If the pure buffer and the liquid containing the coloured substance, in turn, flow through a capillary equivalent to those of the glass powder column the velocities may be different. There is an obvious connection between the velocity difference in this capillary and the boundary disturbances between the same solutions in the separation column, although the former quantity is not concerned with the differential equilibrium changes which occur in the boundary, nor with the restoring transport of liquid outside it. The difference between the capillary velocities of two solutions under constant conditions of flow can be computed with the aid of Poiseuille's equation. Since the liquid pressure is proportional to the density of the solution, we here have a simple qualitative relation between the flow variables, and the following conclusions can be drawn about the conditions in the column.

The change of the velocity due to a density increment in the boundary can be depressed by an increase of the friction in the column. This increase can be achieved absolutely by decreasing the grain size of the glass powder, or relatively by increasing the velocity. Because the resulting displacement due to the velocity increment is the critical factor, the procedures are equivalent only when the time of transfer is a function of the velocity exclusively. For example, if the velocity gradients in a certain system are sufficiently depressed at the velocity used, the time of transfer cannot be arbitrarily increased by the use of a higher column. If a longer time of transfer is needed, effected either by decreasing the velocity or increasing the height of the column, constancy of the convection effect requires a simultaneous change to a finer packing.

It is further evident that a density gradient can be compensated by a proportional increase of the coefficient of viscosity. In the electrolyte solutions used in electrophoresis a concentration increment is in most instances accompanied by an increase of both the density and the viscosity. For this reason the velocity gradient in the boundary is lower than if only a density gradient were present. The experiments showed, however, that the density effect ruled over that of the viscosity in the cases investigated in the apparatus. The observed greater stability of protein gradients than of salt gradients is due to the fact that proteins are generally accompanied by relatively greater viscosity increments than low-molecular substances.

With bands of very viscous solutions reversed conditions may even be expected, so that the viscosity effect rules over that due to the density. This would result in a lower velocity in the protein band than outside it. It was actually observed that when both a low-molecular and a protein band travel along-side in the column, the velocity of the low-molecular substance is generally somewhat greater than that of the protein. As a rule the front of a colour band is convex when the substance is low-molecular, but protein bands very often travel with straight or concave fronts. Pronounced viscosity effects have not been observed with the coloured proteins used in the test experiments. These substances were in general of the al-

bumin type, and it is very probable that other types of proteins will show a different behaviour. Flow disturbances due to a high viscosity of the solution can be reduced by the use of a coarser packing and a lower velocity. If a satisfactory result is not obtained by these means, the viscosity of the protein solution must be reduced by an appropriate change of the concentration.

General aspects on the choice of working conditions. It is generally characteristic of the processes of remixing in the liquid that they become more important as a source of disturbances the longer the experimental time. Hence there are several reasons besides that of stabilizing against convection for keeping the time factor low. Due to the JOULE heat evolved the electrochemical capacity of the apparatus is limited by the efficiency of the cooling system, and the necessary time in the electric field is determined by the amount of electricity needed for the separation. For this reason the electrochemical capacity most often is the limiting factor with regard to the minimum time of transfer in the flow field. As the flow disturbances generally increase with the concentration of the substances to be separated, the stabilizing properties of the packing should be sufficient at least for conserving the highest concentration gradient which may occur during electrophoresis. Ultimately, the protein concentration is limited by restrictions put on the ionic strength for the reason of heat control. The electrical displacement of an ion is accomplished with less production of heat the lower the ionic strength of the flowing liquid. But with a low ionic strength only a relatively low protein concentration can be used without electrical migration disturbances in the boundaries (4, 5). These facts make it evident that the constructional factor, including the material and dimensions of the cuvette and the cooling system, is of superior importance for the efficiency of the fractionation process, and the velocity range and the size of the packing must be chosen with due regard to the requirements in this respect.

Some results from the work with packings of different porosity may be mentioned. In the packings investigated with regard to the stabilizing properties the grain size varied from 0.01 to 0.4 mm, and rates of flow varying between 1 and 200 ml per hour per cm^2 were used. Occasionally, glass beads of 1–2 mm diameter and velocities of 500–1000 ml per hour per cm^2 were tried, but the practical difficulties in keeping high rates of flow and excluding fortuitous hydrostatic pressure disturbances were considerable. Attention was instead concentrated on the powdered glass packings, which were easier in handling.

In these, the general stability of a fluid was still rather low down to grain sizes of 0.15–0.20 mm diameter. As the capillary resistances in the columns were here intrinsically low, only slight pressures were needed to give considerable velocities. These systems were therefore very sensitive to all factors which influenced the pressure in the columns, such as the resistances in the leads and level differences of the liquid in the individual vessels for the supply of the solutions and collecting of the fractions. However, the convection effect in the concentration boundaries was remarkably low even in these systems, and excessively high velocities were never needed. Due to the low resistance to flow the washing out of impurities and shifting from one liquid system to another were rapid operations.

With packings of the finest powder sizes the resistance to flow in the apparatus was considerable at all velocities, and the rate of flow was easily regulated with the aid of the atmospheric pressure. The sharpness of the zone boundaries in these packings has already been stressed (p. 509). The convection effect was very low.

An evidence of this is the fact that salt gradients, such as those due to the electrode liquids, were generally conserved for several hours after the liquid transfer was stopped, whereas in any coarser packing circulation streamings, resulting in a layering of the more concentrated salt solutions at the bottom of the apparatus, quickly became apparent at standstill of the induced transfer. A severe limitation in the usefulness of fine packings is the plugging of the pores by precipitated or adsorbed material from the filtering solutions. This difficulty was met with in work with certain protein mixtures rich in lipids. The accumulation of solid matter caused migration disturbances, and a coarser packing must be used. It is probable that adsorption and surface denaturation phenomena are generally more pronounced in fine packings than in coarser ones.

In consideration of the fact that the displacement relative to the cuvette is the factor which determines the time of transfer through the column, the absolute distance to be performed by a protein particle is longer the finer the packing. Further, in the two migration processes coordinated to give separation the stationary velocity is determined by the ratio of the applied force (the pressure and electrical force, respectively) and the friction. The insertion of a capillary system in the liquid means an increase of the internal friction. If the differences in the amount of remixing do not substantially alter the necessary displacements of the bands, both aspects of the displacement process suggest that the separation requires more energy the finer the packing. In this as in other respects the experimental material collected with the apparatus is incomplete and does not allow definite statements.

Certain general trends as to the choice of working conditions present themselves, however. Fine packings will probably find many applications in laboratory work, especially when the highest precision is needed. In the case of the separation of inorganic isotope ions by the countercurrent electromigration method the processes of remixing in the cell have been extensively investigated by WESTHAVER (9) and BREWER, MADORSKY, and coworkers (8). They recommend the use of granular packings of very small grain size (theoretically: 0.004 mm in diameter or less). Their problem was considerably more difficult than that of separating the main components of serum, and in many respects the working conditions are different in these two types of separation work. But under the specified conditions, and in particular when only small mobility differences should be used to give separation, the results obtained by these workers will prove of general value. When experimental difficulties such as those mentioned above or caused by electroosmotic or viscous effects arise with a fine size packing, a coarser powder must be used, however.

If the electrical mobility differences are favourable for separation, the use of a relatively coarse packing is for many reasons preferable. This conclusion is especially close at hand in case of large scale work where a high yielding capacity and a low risk of accidental disturbances are important economical factors. From the purely hydrodynamic point of view it appears that some degree of turbulence might even be favourable in some respects. Reinforcing the effect of the sidechanneling the increased rate of the exchange reactions together with the lowered sensitivity to pressure gradients tend to a homogenizing of the velocity field (*cf.* p. 507). But evidently the electrical force of separation must in this case be sufficiently strong to balance the increased rate of diffusion.

In biological work the conditions for separation are often favourable, and since all effects of remixing are depressed in packings of fine size powders, it can be ex-

pected that the use of a short time of transfer in a coarse packing or an increased time of transfer in a finer packing will to a certain extent give equivalent conditions. At least in laboratory work it is convenient that various kinds of separations can be performed in the apparatus without changes of the packing. It is therefore desirable that a packing is used which stabilizes over a certain range of velocities chosen with regard to the actual problems.

The working conditions of the present apparatus. The separation column has the dimensions $30 \times 30 \times 1$ cm. The cuvette is made in perspex with cooling mantles attached to the quadratic surfaces. With regard to the JOULE heating and the condition of disturbance-free electric migration ionic strengths of about 0.05 generally give the best results in this apparatus. The passage of 0.5 amp. may rise the temperature to 15°C in the middle of the packing. As a rule the thermal equilibrium is complete within a quarter of an hour. By boundary electrophoresis in free solution the condition of enantiography has been found to limit the protein concentration to 2 %, or suitably lower, in an ionic medium of the strength 0.05. In the present method the boundary anomalies generally appear less important, and considerably higher protein concentrations than 2 % have been run with satisfactory results. 2 % is the concentration of serum protein normally used in the apparatus with the ionic strength 0.05, however.

The packing consists of a fairly coarse glass powder. The grain size is 0.15 mm. It stabilizes well for concentration gradients of the magnitude stated, even when they are due to low-molecular substances only and the lowest velocities are used (about 1 ml per hour per cm^2). The intrinsic resistance in the column is relatively low and allows rapid washings with fresh solutions. The velocity is maintained constant with the aid of the pump apparatus described later in this article. A velocity of 5–10 ml per hour per cm^2 is suitable for keeping the diffusion spreading of the boundaries low. In electrophoresis experiments the passage of about 0.5 amp. and a rate of transfer of 5 ml per hour per cm^2 in the liquid flow field generally correspond to a separation of 4 cm per mobility unit in the level of outflow. With serum solutions a band breadth of 1 cm is used, but if the differences in the electrical velocities are greater and fewer components present it is advantageous to inject the mixture as a broader band.

Fig. 2 illustrates a fractionation of rabbit serum at pH 7.65 in phosphate buffer of the ionic strength 0.05. The curve was obtained by plotting the optical density of the collected fractions against the tube number. The optical density was read in a BECKMAN spectrophotometer at $\mu\mu$ 280. The picture shows a general conformity to the familiar serum diagram of boundary electrophoresis. In this case, however, every peak corresponds to the presence of a single component, or a group of components of approximately the same mobility.

The data reported here are rather an example of a system which has proven to work well in practice and should not be regarded as a standard. The investigation of various types of substances as to their behaviour in the separation column will provide new experiences, and it can be anticipated that new aspects will arise, of importance to the development of this technique.

3. Regulation of the hydrostatic pressure. Velocity disturbances due to the conditions in the cell can hardly be compensated by external means. It is possible, however, to eliminate residual heterogeneities in the leads and the col-

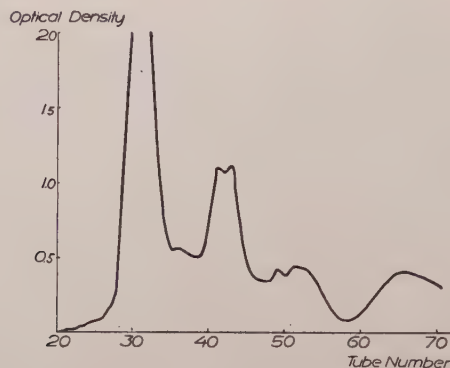


Fig. 2. Electrophoresis of rabbit serum in phosphate buffer. pH = 7.65, $\mu = 0.05$. Total protein concentration: 2 %. Electric current: 510 mA. Liquid velocity: 7 ml per hour per cm^2 .

lecting vessels, and part of the electroosmotic effect by a suitable differentiation of the applied pressure.

The establishment of the electroosmotic pressure-velocity equilibrium can be observed if the apparatus is open to the atmospheric pressure and the free surfaces are divided into a number of non-communicating units of equal cross-section. When no electric current is flowing, a constant velocity is maintained if the liquid is supplied to the receiving tubes at a constant rate and the level difference between the upper and lower liquid surfaces kept constant. Immediately upon closing the current the electroosmotic effect sets in, apparent as a net transport of liquid from the anode towards the cathode. By the electroosmotic flow velocity gradients develop: in the entrance tubes the rate of flow decreases from the anode to the cathode, and if the liquid is allowed to collect in the exit tubes after the passage through the column, a similar differentiation of the velocity takes place here but in the opposite direction. By the unequal rise of the liquid surfaces in the tubes a hydrostatic pressure gradient is developed, which counteracts its own cause, the electroosmotic flow. The horizontal velocity gradient is continuously eliminated, and when the hydrostatic pressure increments just balance the electroosmotic pressure the equilibrium state is reached. The liquid level differences between the corresponding entrance and exit tubes have then attained their final value, and the velocity is again constant in the column. These proceedings can be followed by studying the displacements of colour bands while the equilibrium changes take place. The closing of the current is indicated by more or less marked changes of the direction and the position of a band, and the time until the velocity gradient has vanished is recorded by the subsequent curvature of the band in the velocity field. When equilibrium is reached the band again starts in the column in the original position and direction.

In some liquid systems where vertical zones of varying electrolyte concentration were present, it was observed that the electric current gave rise to corresponding effects with fast initial rates of flow in the dilute parts of the system, which effects were gradually eliminated by the pressure. By the same mechanism irregular pressure increments in the leads can be made to cancel. The automatic elimina-

tion of velocity gradients by the development of balancing counterpressures was referred to as "autocompensation" by SVENSSON and BRATTSTEN (11).

The regulation of the pressure is functionally related to the method of injecting the liquid and the sampling procedure. Two methods have been investigated in some detail in this laboratory. The autocompensation effect gave a hint that this principle could be used for a differentiation of the driving pressure. An apparatus has been constructed for this purpose where a constant pressure difference between the free liquid levels is used to give the desired rate of flow. The supply of liquid to the receiving chambers takes place at a constant rate, and the equilibrium pressure differences are maintained by lowering the stand of the sample collector at a rate corresponding to the rise of the liquid levels in the collecting tubes. With the present experimental arrangement a qualitative test of the method has been made. It can be predicted from the test experiments that this method will be best suited in work with medium and fine size packings, which are not too sensitive to fortuitous pressure changes, and where the electroosmotic effect can generally be reasonably depressed. This machine has not yet been completed, and the definite test of the method has therefore been delayed. By part this is caused by the limited capacity of the workshop, by part it is due to the fact that the investigation of packings of low intrinsic resistance required experimental arrangements that excluded in a more efficient way small accidental disturbances of the flow conditions.

The influence of external pressure variations on the velocity is conveniently controlled by closing the apparatus to the atmospheric pressure and effecting the transfer of liquid by some adjustable pumping or valve mechanism. The differential liquid volumes introduced and withdrawn are thereby directly regulated to give the desired velocity, and the subsequent adjustment of the hydrostatic pressure has to take place by the development of balancing counterpressures within the apparatus. The rigidity of the pumps and the power of the motor which regulates the velocity should be such that the necessary counterpressures can develop. On these principles a set of pumps has been constructed, which will be further described below. They have been tested for about two years in connection with an apparatus open to the atmosphere only at the electrode compartments. The advantages of this pumping arrangement can be summed up in the following way:

1. The pumps can be used for positive as well as for negative displacement of liquid. The same principle is therefore used for feeding liquid into the system as for withdrawal.
2. Liquids can be injected into and withdrawn from a suitable number of mouth-pieces.
3. The relative velocities of the individual pumps can be chosen at will. The absolute velocity is variable over a suitable range. The constancy depends only on the characteristics of the motor that drives the pump apparatus.
4. The pumps simultaneously function as check valves. For this reason they are especially suited in a closed type of apparatus with a packing of low intrinsic resistance. This property also ensures that the pumping velocities are independent of differences of the heights of the liquid levels in the supply vessels and heterogeneities in the leads.

5. A free liquid layer on top of the glass powder can be avoided. If a free liquid layer is present, part of the electric current will pass through this layer instead of the glass powder zone.

Description of the pumping apparatus

The principle of the pump is well-known and used in a variety of forms. One type of pump, manufactured for industrial purposes, is described by RIEGEL (20). Another modification is used for blood transfusion (21). Recently the same principle was applied by GLENN and HACKERMANN in a pumping device for the transfer of corrosive fluids (22).

The pump works in the following way. A piece of tubing from the liquid to be transferred passes between a fixed metal wall and four metal cylinders mounted equidistantly around the same axis. As the axis rotates, each of the cylinders, in turn, is brought against the fixed metal wall, thereby exercising pressure on the tubing, which is alternatively contracted and released. A following roller always closes the tubing before the pressure of the preceding one is released. The result is a continuous pumping action.

This kind of pump is very suitable in cases where a constant slow displacement of liquid is essential. In blood transfusion and in work with corrosive fluids the main advantage is that the liquid can be transferred without contact with any metal parts of the apparatus. In continuous electrophoresis the problem is partly different. We are here faced with the necessity of injecting and withdrawing constant amounts of liquid from a considerable number of entrance and exit points. Syringes and proportioning pumps and certain types of valves have been tested previously for use in preparative electrophoresis¹, but the accuracy was generally too low. In addition, a set up of more than one hundred syringes would be very expensive and complicated to deal with in routine work.

The pumping machine is most easily described with reference to Fig. 3 and Fig. 4 a and b. Fig. 3 shows this apparatus connected to the glass powder cuvette and the fraction collecting tubes. To isolate the separation column from vibrations originating in electrical motors in the neighbourhood, for example the motor driving the pumps, the cuvette is mounted on a separate table.

The pump apparatus is divided into six segments, each comprising twenty tubes. The two upper segments are connected to the inlet tubes of the cuvette and feed liquid into the system. The four lower pumping segments withdraw liquid from the apparatus.

The shafts of the upper and lower segments are united by means of a chain and gears, but as there are twice as many outlet as inlet units in the present cuvette, an exchange of 1:2 between the gears is needed to give the right speed of revolution to the two axes. The shaft is rotated by a motor (220 volts d. c., 1/8 horse power, 2000 rev. per min.) with the aid of a gear switch, a spiral switch and a belt drive and pulleys. The velocity is regulated by a resistance in series with the motor and by varying the dimensions of the pulleys.

One pump segment is shown in Fig. 4 a and b. Each ten tubes are attached to one metal block. The two metal blocks are fixed symmetrically around the pump

¹ SVENSSON, H., unpublished, Uppsala (1946-48).

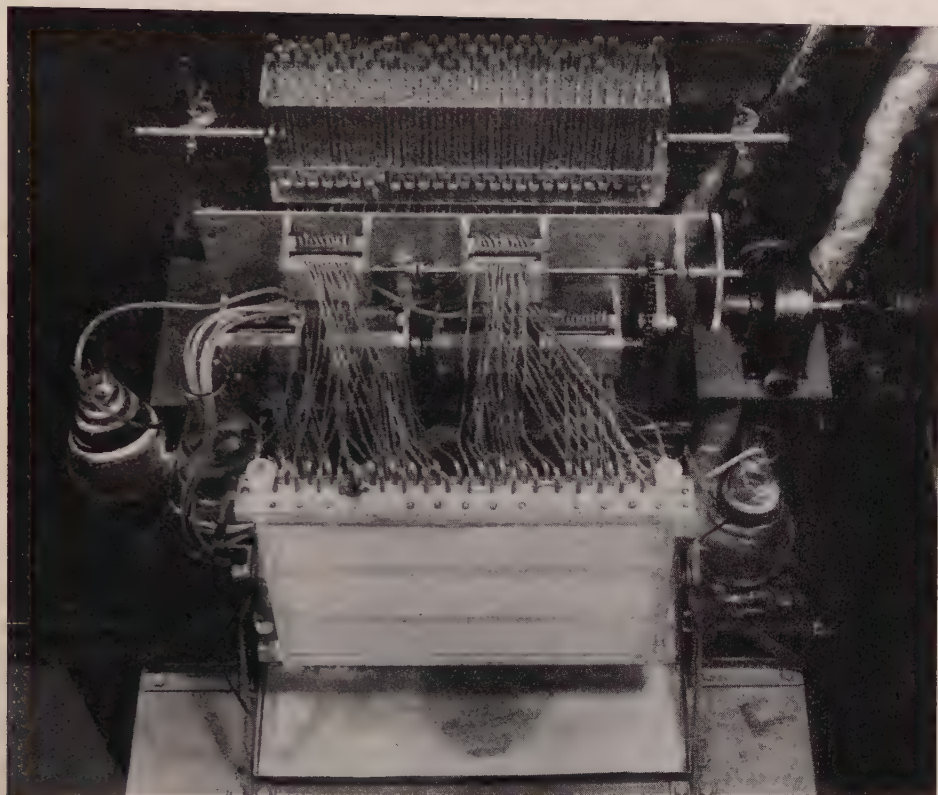


Fig. 3. Photograph of the pump apparatus connected to the glass powder cuvette and the fraction collecting tubes.

spindle. Two opposite rollers are therefore simultaneously against one set of tubes each. By this arrangement a symmetrical pressure is exerted on the slide bearings in the side walls. Glass joints just outside the passages of the tubes in the plates serve to keep the tubing in position. The rollers, the shafts, and the plugs in the drivers are machined in stainless steel. The drivers and the sleeve with the holder plates for the rollers are made in brass; remaining parts are in aluminium.

The tubes are mounted between sheets of a close texture cloth. This has proven of great value to reduce the wear and tear of the rollers on the tubing. The distance between the rollers and the fixed metal walls is adjusted by glueing additional layers of cloth to the walls. It is essential for the lifelength of the tubing that a minimum pressure is exercised by the rollers in closing the tubing.

The absolute velocity of flow is determined by the speed of the rollers and the cross-section area of the tubing. In choosing material for the tubing the following qualities are essential:

1. The tubing should close at as low pressure as possible.
2. The tubing should be resistant to internal pressure. This property is essential in systems where the electroosmotic force is important.

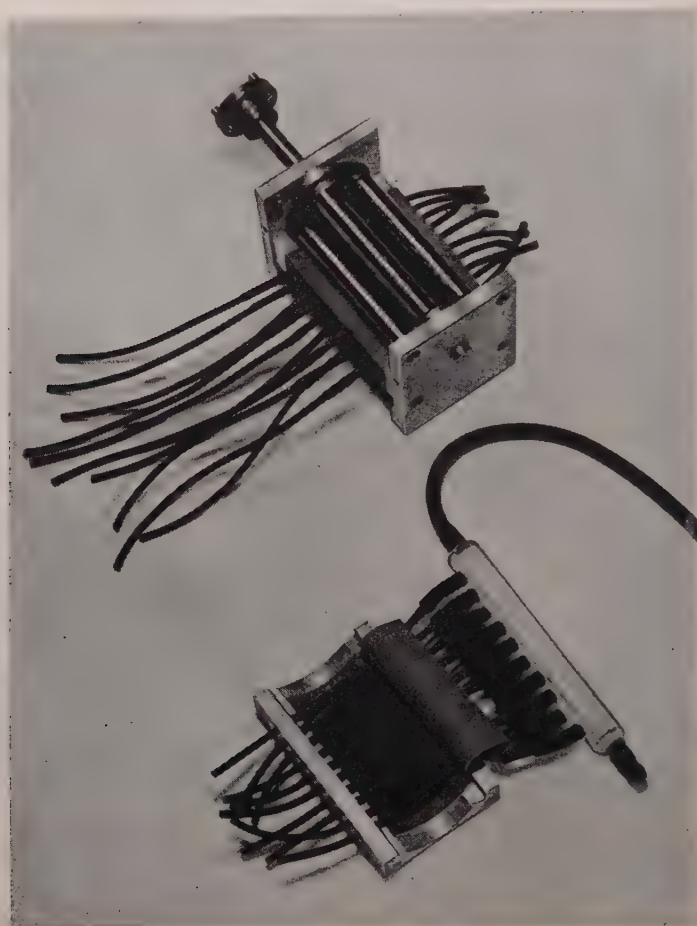


Fig. 4a. Photograph of a pumping segment.

3. The tubing should be highly elastic to external pressure and release of pressure, although resistant to stretching in the longitudinal direction.

For a certain material, these requirements are best met with by a narrow size tubing. On the other hand, the pumping velocity cannot be increased at will by increasing the velocity of the rollers. The wear on the tubing increases very rapidly with the speed of the rollers, and in addition, a pulsating movement of the liquid would result, due to the alternating stretching and contracting of the tubing. This effect is slightly perceptible at the highest velocities in the present machine. Although the sharpness of the bands does not seem to be influenced under the prevailing conditions, it is evident that an increase of the velocity should be achieved by increasing the diameter of the tubing rather than the speed of the rollers. In the present machine a soft kind of rubber tubing of 1.3 mm inner diameter and 0.2 mm wall thickness is used. The speed of the rollers is regulated to give a range of velocities from 1 to 15 ml per hour per tube. At an average velocity of 10 ml

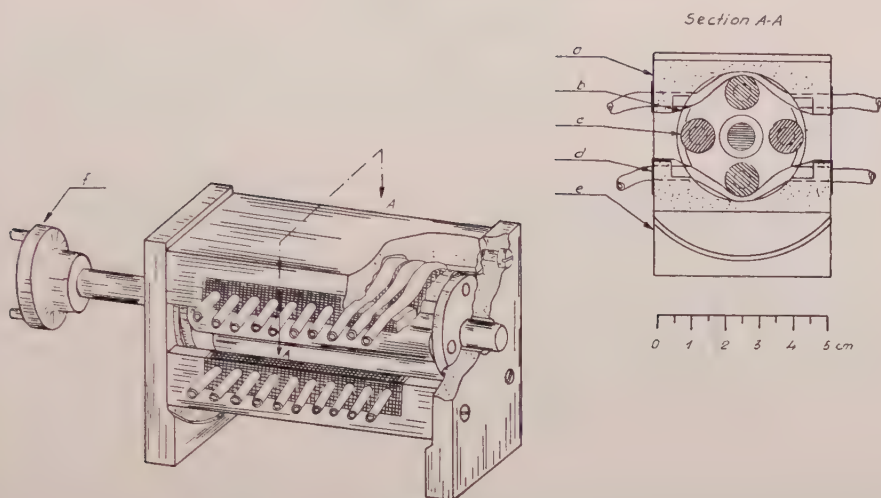


Fig. 4 b. *a.* Upper fixed plate with tubing attached. *b.* Cloth between tubing und roller. *c.* Pump spindle. *d.* Lower fixed plate with tubing attached. *e.* Side wall. *f.* Driver.

per hour the life length of the tubing is about 300 hours. It is very probable, however, that a more resistant tubing material can be found, for instance latex, which does not contain pigment, or some kind of plastic, such as nylon.

For use in the pump apparatus, the tubing is cut into pieces of 10 cm length. Each piece of tubing is calibrated, and those are chosen which give the same volume displacement under standard conditions.

SUMMARY

In continuous zone electrophoresis by the technique described by SVENSSON and BRATTSTEN (11) one main problem was the arrangement of a constant liquid velocity in the separation column. The experimental condition to be satisfied is that the remixing caused by velocity gradients during electrophoresis should be negligible relative to the separation in each case. Among the factors which give rise to velocity gradients are heterogeneity of the capillary resistance in the packing and outside it in the leads for the liquid, concentration gradients due to the JOULE heating and the presence in the flowing liquid of the substances to be separated, and the electroosmotic pressure-velocity equilibrium. These factors are reviewed, and the choice of a suitable grain size of the packing and the velocity are discussed on the basis of experiments.

The present apparatus is designed for preparation work in a laboratory scale, with the separation of the proteins of blood serum as a standard operation. The characteristics of the separation system are reported together with an example of a serum fractionation.

The liquid velocity can be regulated either indirectly by the regulation of the hydrostatic pressure or directly by means of adjustable pumps. A pumping apparatus for the transfer of liquid is described. This machine, which has been in use for about two years, works with a high precision over a velocity range of 1–15 ml per hour per cm^2 .

Acknowledgements

The idea of using peristaltic pumps for the transfer of the liquid was suggested by Professor A. TISELIUS. *Ingenjör* M. SKAGWARD, Göteborg, and Mr. I. ERIKSSON, Head of the workshop of this Institute, have aided in the construction of the pump apparatus.

The author is indebted to Professor A. TISELIUS and Professor S. CLAEßSON for permission to carry out this investigation at the Institutes of Biochemistry and Physical Chemistry.

My thanks are due to Mr. S. JANSSON of the workshop for skilful and interested machining work, and to *Fil. lic.* P. O. OLSSON, Stockholm, for revision of the manuscript from the hydrodynamic point of view.

The work on preparative electrophoresis is financially supported by the Swedish Natural Science Research Council.

Institute of Biochemistry, University of Uppsala, Sweden.

REFERENCES. 1. Svensson, H., *Advances in Prot. Chem.* *IV* (1948) 251. — 2. Adolf, M., and Pauli, W., *Biochem. Z.* *152* (1924) 360. — 3. Tiselius, A., *Trans. Farad. Soc.* *33* (1937) 524. — 4. Tiselius, A., *Nova Acta Reg. Soc. Sci. Upsal.* *IV*, 7 No. 4 (1930). — 5. Svensson, H., *Arkiv Kemi Mineral. Geol.* *22A*, No. 10 (1946). — 6. Philpot, J. S. L., *Trans. Farad. Soc.* *36* (1940) 38. — 7. Lodge, O., *Britt. Ass. Rep.* 1886, 389. — 8. Brewer, A. K., Madorsky, S. L., Taylor, J. K., Dibeler, V. H., Bradt, P., Parham, O. L., Britten, R. J., and Reid Jr. J. G., *J. Res. Nat. Bur. Standards* *38* (1947) 137. — 9. Westhaver, J. W., *J. Res. Nat. Bur. Standards*, *38* (1947) 169. — 10. Cann, J. R., Kirkwood, J. G., Brown, R. A., and Plescia, O. J., *J. Am. Chem. Soc.* *71* (1949) 1603. — 11. Svensson, H., and Brattsten, I., *Arkiv för Kemi I* 1949 401. — 12. Grassmann, W., and Hannig, K., *Z. angew. chem.* *62* (1950) 170. — 13. Grassmann, W., and Hannig, K., *Naturwiss.* *37* (1950) 397. — 14. Brattsten, I., and Nilsson, A., *Arkiv för Kemi* *3* (1951) 337. — 15. Durrum, E. L., *J. Am. Chem. Soc.* *73* (1951) 4875. — 16. Haugaard, G., and Kroner, T. D., *J. A. C. S.* *70* (1948) 2135. — 17. Prandtl, L., *Handb. der Experimentalphysik*, Leipzig (1931) *IV:1*, 30. — 18. Schmidt, W., *Probleme der kosmischen Physik* *7* (1925) 9. — 19. Porter, A. W., and Rao, P. A. M., *Trans. Farad. Soc.* *23* (1927) 311. — 20. Riegel, E. R., *Chemical Machinery*, New York 1944, 137. — 21. Riddell, V., *Blood Transfusion*, London 1939, 213. — 22. Glenn, Jr., E. E., and Hackermann, N., *Rev. Sci. Instr.* *21* (1950) 148.

Tryckt den 8 november 1952

Uppsala 1952. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

Über die Natur der Stärkegrenzdextrine

II. Die Grenzdextrine einer Pilzamyrase

Von KARL MYRBÄCK und EBBA WILLSTAEDT

Mit 4 Figuren im Text

Kartoffelstärke wurde mit Diastase Merck möglichst vollständig verzuckert. Die Enzymmenge war sehr gross und die Versuchszeit wurde sehr lang ausgedehnt, um die Bildung „falscher“ Grenzdextrine zu vermeiden.

700 g Kartoffelstärke (Trockengewicht) wurden mit 10 Litern Wasser verkleistert und etwa 10 Minuten gekocht. Nach Abkühlung wurde eine filtrierte Lösung von 10 g Merckscher Diastase zugesetzt. Die Mischung wurde, von einer Toluolschicht bedeckt, bei 30° aufbewahrt. Nach 5 Tagen entsprach die Reduktion der Lösung einer Bildung von etwa 90% Maltose. Gärversuche in kleinem Masstabe zeigten die Anwesenheit von etwas mehr als 600 g Maltose an. Die Mischung blieb insgesamt 75 Tage stehen. Die Reduktion nahm dabei nur ganz wenig zu. Nach Gärungsversuchen waren endlich etwa 630 g Maltose aber nur ganz unbedeutende Mengen von Glucose vorhanden. Die Versuchsmischung wurde klar filtriert und auf etwa 6 Liter eingeeengt. 200 g frischer Presshefe wurden zugesetzt; nach 20 Stunden bei 30° waren alle eingermassen leicht vergärbaren Stoffe beseitigt, was durch besondere Gärversuche kontrolliert wurde. Die Hefe wurde durch eine Schicht von Kieselgur abgesaugt und das Filtrat stark eingeeengt. Die Lösung enthielt offenbar die unvergärbaren Grenzdextrine.

An der Grenzdextrinlösung (250 ml) wurde Reduktionsbestimmungen vor und nach vollständiger Hydrolyse mit N Schwefelsäure ausgeführt. Bestimmungen nach den Methoden von BERTRAND, WILLSTÄTTER-SCHUDEL und von SOMOGYI (1) gaben sehr nahe übereinstimmende Werte. Vor der Hydrolyse wurde ein scheinbarer Glucosegehalt von 0,15 g/ml erhalten; nach der Hydrolyse war der entsprechende Wert 0,45 g/ml. Der mittlere Polymerisationsgrad der Dextrine liegt also sehr nahe an 3 Einheiten. Die Totalmenge der erhaltenen Grenzdextrine ist etwa 110 g oder etwa 16% der Stärke. Nimmt man an, dass jede Isomaltosebindung des Amylopektins einem Grenzdextrinmolekül mit 3 Glucoseresten entspricht, so sollte die Ausbeute an Grenzdextrin etwa 15% sein.

Die Grenzdextrine wurden mit Alkohol fraktioniert ausgefällt, wobei 8 Fraktionen erhalten wurden (Tabelle 1). Das Filtrat von der Fraktion 8 wurde zum Sirup eingeeengt und mit viel absolutem Alkohol verrieben. Dabei wurde die Fraktion 9 als alkoholunlöslicher Rest erhalten. Die Alkohollösung wurde zum Trockene eingedampft: Fraktion 10.

Tabelle 1

Fraktion Nr	ml Alkohol	Ausbedeute, g	Mittleres Mole- kulargewicht
1	400	12	720
2	500	11	660
3	600	14	615
4	700	8,5	530
5	900	10	530
6	1 100	6	530
7	1 400	4	480
8	2 900	8	520
9	—	16,5	510
10	—	15,5	340
		105,5	

Gärversuche mit frischer Presshefe zeigten, dass sämtliche Fraktionen frei von Glucose und Maltose waren. Da die Hefe Maltotriose recht schnell vergärt (2), konnte auch auf Abwesenheit dieses Zuckers geschlossen werden. Durch trockene Brauereihefe werden die Fraktionen weitgehend vergoren. Über die diesbezüglichen Versuche wird an anderer Stelle berichtet werden.

Das mittlere Molekulargewicht der Fraktionen wurde bestimmt; als Beispiel führen wir Versuche mit der Fraktion 6 an. Die Reduktion nach BERTRAND entsprach 32,5% Glucose, woraus sich ein mittleres Molekulargewicht von 554 berechnet. Nach WILLSTÄTTER-SCHUDEL wurde ein scheinbarer Glucosegehalt von 34,6% und dementsprechend ein Molekulargewicht von 521 gefunden. Bei der Hydrolyse in *N* Schwefelsäure bei 100° wurden die folgenden Ausbeuten an Glucose erhalten:

nach 4 Stunden	89,8%
» 6 »	97,8%
» 8 »	101,9%

Der Versuch zeigt, dass die Hydrolyse erst langsam vollständig wird, was damit im Einklang ist, dass die Dextrine ausser den Maltosebindungen auch die schwer hydrolysierbaren Isomaltosebindungen enthalten (3). In derselben Weise wurden die mittleren Molekulargewichte der verschiedenen Dextrinfraktionen bestimmt: Tabelle 1. Es geht hervor, dass die letzte Fraktion Disaccharide enthält. Da keine Maltose anwesend ist, so ist zu schliessen, dass diese Fraktion aus Isomaltose besteht. Die Fraktionen 4–9 haben alle Molekulargewichte, aus welchen hervorgeht, dass sie hauptsächlich Trisaccharide enthalten. Von den ersten drei Fraktionen scheint die Dritte Tri- und Tetrasaccharide zu enthalten; das Molekulargewicht der zweiten Fraktion stimmt mit dem eines Tetrasaccharids überein, während die erste Fraktion ausser Tetrasaccharide auch höhere Saccharide zu enthalten scheint. In der Abbildung 1 sind die Ausbeuten und Molekulargewichte der Fraktionen veranschaulicht. Offenbar sind die Trisaccharide vorherrschend. Die in der letzten Fraktion vorhandene Isomaltose kann entweder durch Abspaltung von Maltose aus gewissen α -Dextrinen (vgl. die Figur 1 der unter (4) zitierten Arbeit) oder durch Abspaltung von Glucose aus Trisacchariden hervorgegangen sein.

Aus den Ausbeuten an den verschiedenen Grenzdextrinfraktionen lässt sich unter

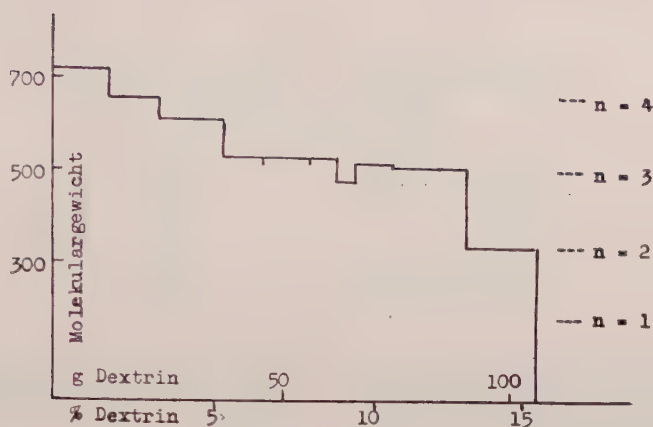


Fig. 1. Ausbeute an Grenzdextrine und Molekulargewichte derselben.

der Annahme, dass jedes Grenzdextrinmolekül eine Isomaltosebindung enthält, die Zahl der Isomaltosebindungen in der Stärke zu 4,7% berechnen, was ja mit den Endgruppenbestimmungen im Einklang ist. In dem angewendeten Enzympräparat scheint also kein Enzym vorhanden zu sein, das Isomaltosebindungen hydrolysieren kann.

Man fragt sich nun, ob die isolierten Grenzdextrine wirklich in dem Sinne Grenzdextrine sind, dass sie vom angewendeten Enzym überhaupt nicht angegriffen werden. Das Enzym war zwar in dem oben besprochenen Versuch beim Abbruch desselben noch aktiv, aber die anwesende Maltose übt sicher eine beträchtliche Hemmung aus. Auf alle Fälle ist es aber klar, dass die Spaltbarkeit der Bindungen in den kurzkettigen, verzweigten Dextrinen im Verhältnis zur Spaltungsgeschwindigkeit spaltbarer Bindungen in den Polysacchariden, sehr klein ist, aber unmöglich ist nicht, dass die Stabilität der Bindungen in den isolierten Dextrinen eine relative ist. Versuch dass die Stabilität der Bindungen in den isolierten Dextrinen eine relative ist. Versuche über die Spaltbarkeit der isolierten Fraktionen mit verschiedenen α -Amylasen wurden deshalb ausgeführt, wobei grosse Enzymmengen zur Anwendung kamen. Die Fraktion 3 mit dem mittleren Molekulargewicht 615 wurde zunächst untersucht. Sie dürfte zu ungefähr 1/3 Trisaccharide enthalten; im Rest dürften Tetrasaccharide vorherrschen.

Versuch mit Takadiastase

0,877 g Dextrin 3 wurden in 10 ml Wasser gelöst. 5 ml Phosphatpuffer (pH=5,3) und 5 ml einer 1% Lösung käuflicher Takadiastase wurden zugesetzt, und die Mischung wurde bei 30° aufbewahrt (Toluol). Zu verschiedenen Zeiten wurde in Proben von 5 ml die Reduktion nach WILLSTÄTTER-SCHUDEL bestimmt und als Glucose berechnet: Tabelle 2.

Es geht also hervor, dass das Grenzdextrin durch die Takadiastase allmählich fast vollständig in Glucose zerlegt wird. Die Spaltung bleibt also nicht etwa auf der Isomaltosestufe stehen, sondern auch die 1,6-Bindungen werden gesprengt. Eine derartige vollständige Zerlegung der Stärke durch Takadiastase ist auch früher beobachtet worden (5). Von einigen Verfassern wird aber angegeben, dass einige

Tabelle 2

Zeit	% Glucose
Vor der Spaltung	29,3
30 Min.	41,9
3 St.	44,7
48 »	72,4
4 Tage	85,7
6 »	92,1
7 »	92,1
11 »	95,0

Präparate von Takadiastase Stärke in Glucose + Isomaltose spalten (6). Anzunehmen wäre dann, dass die Spaltung der Isomaltose durch eine besondere Glucosidase hervorgerufen wird.

Die Tabelle 2 zeigt, dass im untersuchten Dextrin eine gewisse Zahl der Bindungen viel leichter gesprengt wird als die übrigen. Dieser Anteil entspricht etwa 13% Glucose. Dieselbe Erscheinung wird auch in den unten zu besprechenden Versuchen mit anderen α -Amylasen beobachtet. Es liegt nahe zu vermuten, dass diese schnellere Spaltung eine Abspaltung von Zucker aus den Tetrasacchariden ist.

Dass bei der Spaltung des Dextrins durch Takadiastase grosse Mengen von Glucose entstehen, wurde durch Gärversuche kontrolliert (7). Nach einer Verdauungszeit von 15 Tagen wurden 5 ml des Gemisches zum Trockenen eingedampft, in 2 ml Wasser gelöst und mit 2 ml einer Suspension von Presshefe in Wasser (1:1) versetzt. Die Kohlensäureentwicklung wurde manometrisch verfolgt. Parallelversuchen mit reinen Zuckern: Figur 2.

Ein Vergleich der Kurven der Abbildung 2 zeigt, dass im Verdauungsgemisch etwa 83 mg vergärbbarer Zucker vorhanden sind, wovon die Hauptmenge Glucose ist. Der obere Teil der Kurve 4 zeigt aber, dass neben der Glucose auch kleinere Mengen schwer vergärbbarer Zucker anwesend sind. Vergleicht man mit den Maltosekurven 2 und 3, so erscheint es nicht ausgeschlossen, dass im Verdauungsgemisch Maltose anwesend ist, deren Menge aber klein sein muss. Die Gärgeschwindigkeit der Hauptmenge der schwer vergärbaren Zucker ist aber so niedrig, dass die Gärung keine Maltosegärung sein kann. Es dürfte angenommen werden können, dass sie eine Isomaltosegärung ist.

Da das Verdauungsgemisch ursprünglich 877 mg Dextrin enthielt und etwa 830 mg vergoren worden sind, so muss ein kleiner Rest unvergoren geblieben sein. Nach Aufhören der Gärung wurde deshalb die Gärflüssigkeit klar filtriert, zum Trockenen eingengt und wieder in Wasser gelöst. Vor und nach vollständiger Hydrolyse in *N* Schwefelsäure wurde die Reduktion nach SOMOGYI bestimmt. Auf das ganze Verdauungsgemisch umgerechnet wurde nach der Hydrolyse 41,5 mg Glucose gefunden, was ja mit dem aus den Gärversuchen berechneten Defizit übereinstimmt. Vor der Hydrolyse entsprach die Reduktion 15,0 mg Glucose, woraus geschlossen werden kann, dass der unvergorene Rest aus Trisacchariden besteht.

Versuche mit anderen α -Amylasen

Die Versuche wurden genau so angeordnet wie der obige Versuch mit Takadiastase. Die angewendeten Enzyme waren:

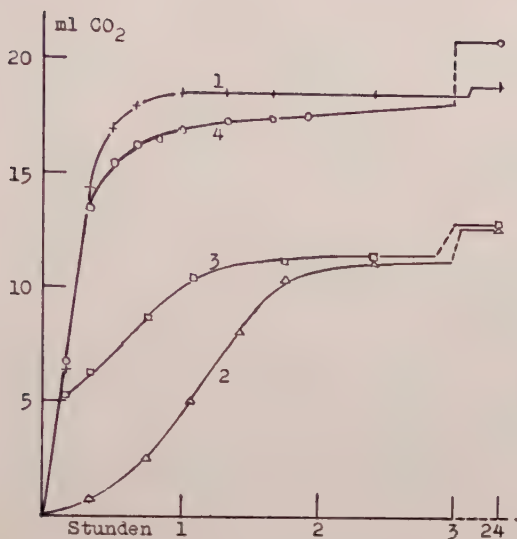


Fig. 2. Gärungsversuch: Kurve 1, 75 mg Glucose
 2, 50 mg Maltose
 3, 20 mg Glucose + 30 mg Maltose
 4, 5 ml Hydrolysat

- Versuche 1: 5 ml einer 1 % Lösung von Diastase Merck.
 2: 5 ml unverdünnter, filtrierter Speichel.
 3: 5 ml einer 1 % Lösung gereinigter Pankreas-Amylase.
 4: 5 ml einer 1 % Lösung gereinigter α -Malzamyrase.

Die pflanzlichen Amylasen wurden bei pH=5,3, die tierischen bei pH= 6,9 und 0,4 % NaCl untersucht. Die gefundenen Spaltungskurven sind in der Figur 3 zusammengefasst. Zum Vergleich ist die mit Takadiastase erhaltene Kurve mit angeführt. Alle die vier hier untersuchten Amylasen bedingen nur eine sehr langsame Spaltung des Dextrins. Wie im Falle der Takadiastase werden anfangs einige Bindungen schneller gelöst, dann folgt ein sehr langsames Ansteigen der Reduktion. In den Versuchen mit Merckscher Diastase und mit den tierischen α -Amylasen erreicht die Reduktion nach 2 Monaten einen Wert von rund 60 % Glucose, was ja einer Mischung von Disaccharid mit wenig Glucose entspricht. Die Verteilung der entstandenen Produkte auf verschiedene Polymerisationsgrade kann durch Gärungsversuche bis zu einem gewissen Grade bestimmt werden. Zwei Gärungsversuche, die nach einer Hydrolysenzeit von 36 Tagen ausgeführt wurden, sind in der Figur 4 zusammengefasst. Im Versuch 1 mit Merckscher Diastase sind also, auf ein Volumen von 50 ml umgerechnet, etwa 180 mg Glucose und etwa 320 mg sonst vergärbarer Zucker entstanden. Ein Vergleich zwischen den Kurven 2 und 3 scheint anzudeuten, dass Maltose in nicht ganz geringen Mengen vorkommt, wahrscheinlich besteht die vergärbare Disaccharidfraktion etwa zur Hälfte aus Maltose und zur Hälfte aus Isomaltose. Dies wäre so zu erklären, dass im Ausgangsmaterial Tetrasaccharide (oder möglicherweise höhere Saccharide) vorkommen, aus welchen durch Spaltung einer 1,4-Bindung Maltose hervorgehen kann. Im Versuch 4 mit α -Malzamyrase

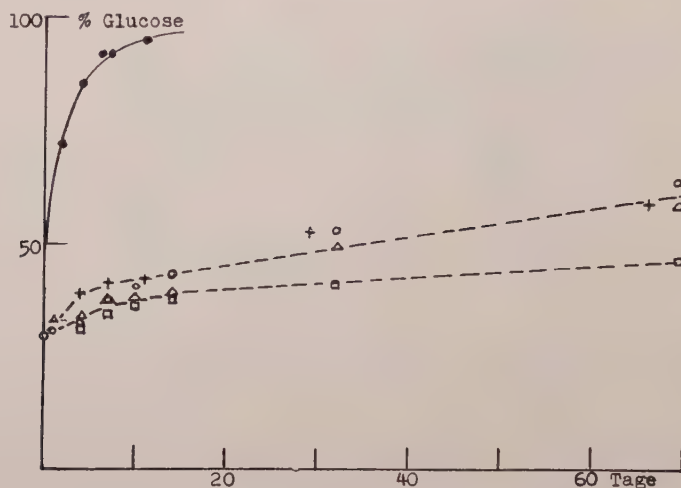


Fig. 3. Spaltung einer Grenzextrinfraction:

- Takadiastase
- Mercks Diastase
- △ Pancreasamylase
- + Speichelamylase
- α-Malzamylase

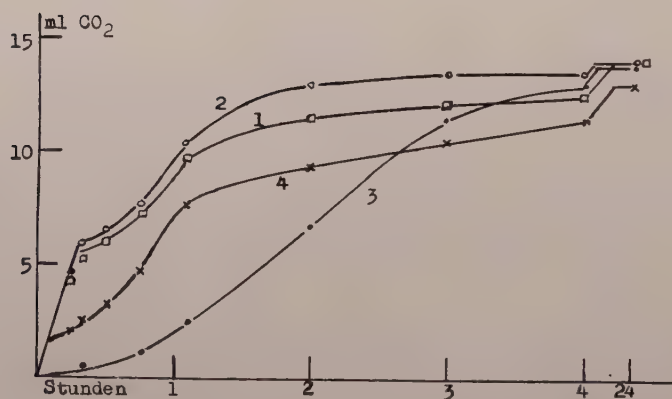


Fig. 4. Gärungsversuch; Kurve 1, Hydrolysat mit Mercks Diastase
 2, 20 mg Glucose + 50 mg Maltose
 3, 50 mg Maltose
 4, Hydrolysat mit α-Malzamylase

ist weniger Glucose entstanden (Kurve 4 der Figur 4); die mehr oder weniger schwer vergärbare Disaccharidfraktion hat aber auch hier eine beträchtliche Grösse.

Aus unseren Versuchen scheint also hervorzugehen, dass ein Trisaccharid mit je einer Maltose- und einer Isomaltose-bindung als der wesentliche Bestandteil der aus Amylopectin durch die untersuchte Amylase gebildeten Grenzextrine ist. Die Bildung eines derartigen Trisaccharids durch amylytischen Abbau von Stärke wurde

zuerst von AHLBORG und MYRBÄCK (8) beobachtet. Das Vorkommen einer Isomaltosebindung im Trisaccharid wurde durch Bestimmung der 2,3,4-Trimethylglucose nach erschöpfender Menthylierung und Hydrolyse bewiesen. Die enzymatische Bildung der Isomaltose wurde ebenfalls festgestellt (9).

Das Trisaccharid scheint durch das Enzympräparat sehr langsam weiter gespalten zu werden. Ob diese Spaltung wirklich der Amylase zuzuschreiben ist, lässt sich noch nicht sagen. Auf alle Fälle wird das Trisaccharid im Verhältnis zu höheren Sacchariden äusserst langsam angegriffen.

Institut für organische Chemie und Biochemie der Universität Stockholm.

LITERATUR: 1. Somogyi, M., *J. Biol. Chem.* *160*, 61 (1945). — 2. Myrbäck, K. und Leissner, E., *Arkiv Kemi, Mineral. Geol.* *17 A*, Nr 18 (1943). — 3. Myrbäck, K., Örtenblad, B. und Ahlborg, K., *Biochem. Z.* *307*, 53 (1940). — 4. Myrbäck, K., *Arkiv Kemi* *4*, 433 (1951). — 5. Weinmann, H., *J. Biol. Chem.* *164*, 7 (1946). — 6. Montgomery, E. M., Weakley, F. B. und Hilbert, G. E., *J. Am. Chem. Soc.* *69*, 2249 (1947) und *71*, 1682 (1949). — 7. Myrbäck, K., *Biochem. Z.* *307*, 140 (1941). — 8. Myrbäck, K. und Ahlborg, K., *Biochem. Z.* *307*, 69 (1940). — 9. Ahlborg, K. und Myrbäck, K., *Biochem. Z.* *308*, 187 (1941).

Tryckt den 8 november 1952

Uppsala 1952. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

Inactivation of barley β -amylase by sodium dodecyl sulfate

By KARL MYRBÄCK and BARBRO PERSSON

With 2 figures in the text

Determination of the activity-pH-curves at different substrate concentrations have shown that, in the case of several hydrolyzing enzymes exhibiting their maximum activity in weakly acid solution, basic groups of the enzyme molecules are involved in the formation of the enzyme-substrate compounds (1). The acid branches of the pH-curves are displaced to the acid side with increasing substrate concentration whereas the alkaline branches of the curves are independent thereof. Since the nature of the enzyme-substrate compound and, therefore, the nature of the substrate-binding groups of the enzyme molecule, is one of the most fundamentally important problems of enzyme chemistry, the inactivation of enzymes by reagents, which can be supposed to react with the basic substrate-binding groups, must be considered worthy of study. The inactivation of β -amylase by heparin has been investigated (1); the results are in general agreement with the idea that the action of heparin on β -amylase commences as a simple salt formation but is complicated in various ways. The complications are doubtlessly caused by the extraordinary chemical nature of heparin: the high molecular weight and the extremely high negative charge. In the following, experiments with dodecyl sulfate will be described. This substance was chosen as a relatively simple reagent with high negative charge. However, already known facts concerning the action of dodecyl sulfate and similar substances on proteins allow the conclusion that the inactivation of β -amylase by dodecyl sulfate can probably not be expected to be a simple salt formation.

Experimental work and theories concerning the action of detergents on proteins have been admirably reviewed by LUNDGREN (2), and the reader is referred to the paper for general information. A few investigations of special interest may be mentioned here. PUTNAM and NEURATH (3) find that the combination of serum albumin and dodecyl sulfate is independent of pH in the range 4.5–6.8 and assume that the sulfate is bound by cationic groups which do not alter their charge in the pH-range mentioned. Complexes of dodecyl sulfate with gelatin have been studied by PANKHURST (4). McMEEKIN *et al.* (5) have described a crystalline compound of β -lactoglobulin with dodecyl sulfate. HUGHES (6) has reported that bacterial glutaminase and glutamic decarboxylase are inhibited by anionic detergents. GUSTAVSON (7) has investigated the action on collagens of mammals and teleostei and concludes that the general concept, advanced by LUNDGREN, gives a satisfactory explanation.

In connection with experiments on dodecyl sulfate, an investigation by TERESI and LUCK (8) on the combination of serum albumin with fatty acid anions is of considerable interest.

The binding of the ions is thought to be mediated by two types of "active sites" on the enzyme surface, one positively charged and one uncharged. That a non-polar interaction takes place was deduced from the fact that the strength of the binding is enhanced by an increase of the chain length of the organic anion.

Table 1

Reaction time min	a) No inhibitor		b) 17.4 mg NaDS	
	percent glucose	$k \cdot 10^3$	percent glucose	$k \cdot 10^3$
0.5	1.4	50	—	—
4	8.9	48	7.3	38
8	14.6	48	12.1	36
10	15.9	44	13.3	33
20	18.7	(30)	14.5	(19)
60	19.5	—	16.0	—

In our experiments a partly purified β -amylase preparation from six-row barley was used. It was free from α -amylase and maltase. 25 ml 2 percent solution of native potato starch, 2.5 ml acetate buffer (total concentration of acetic acid in the buffers was 2 M) and water (25°) were mixed with 1 ml enzyme solution or a corresponding amount of enzyme-inhibitor mixture. The amount of water was such that the total volume was 50 ml. After suitable times the reducing power was determined according to WILLSTÄTTER and SCHUDEL in 5 ml samples. 6–9 determinations were made in each experiment. The reducing power was calculated as mg glucose and the monomolecular formula was used for calculating the reaction velocity. The k -values of each experiment (without inhibitor) were fairly constant if calculated under the assumption that the reducing value for $t = \infty$ corresponds to 25 percent glucose. Two experiments may be recorded to show this (Table 1); pH in both experiments 4.87.

a) 1 ml enzyme solution, no inhibitor

b) 1 ml enzyme solution, 17.4 mg sodium dodecyl sulfate (NaDS) in the assay mixture. No previous incubation of enzyme and inhibitor.

Table 2

Incubation with NaDS mg	Reducing power (percent glucose)								
	0.5 min	3 min	5 min	7 min	10 min	20 min	30 min	40 min	70 Hrs
0	1.3	5.8	—	11.8	15.1	—	23.6	—	25.1
0.15	1.0	4.4	—	9.5	13.4	—	22.5	—	24.2
0.21	0.7	3.8	—	10.0	13.2	—	21.8	—	24.8
0.26	0.5	3.7	—	8.3	11.1	—	—	—	25.2
0.41	—	—	1.4	—	3.0	6.5	—	—	24.8
0.51	—	—	—	1.8	2.2	4.5	—	9.6	—
0.61	—	—	—	0.9	—	—	2.2	—	21.9
0.93	—	—	—	0.3	—	—	—	0.6	22.0

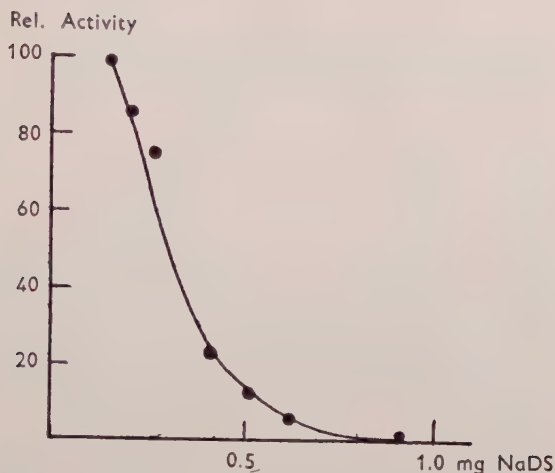


Fig. 1. Inactivation by increasing amounts of NaDS.

The inhibition which initially is rather small seems to progress somewhat with time. Further experiments showed, that if the enzyme is incubated with NaDS for some time, and then mixed with substrate, a strong inactivation is caused already by very small amounts of NaDS. In the following series 2 ml enzyme solution, 0.5 ml buffer ($\text{pH} = 4.87$), NaDS and water were mixed and incubated for one hour at 20° . Total volume 4 ml. After incubation 2 ml were transferred to the substrate solution and the increase of reducing power was determined. If the amount of NaDS used was > 1.5 mg the activity was completely lost. Experiments with smaller amounts of NaDS in Table 2.

It appears (Fig. 1) that amounts of NaDS smaller than 0.15 mg have no action, presumably because some contaminating substance in the enzyme preparation binds NaDS stronger than does the enzyme. Further addition of about 0.3 mg NaDS causes almost complete inactivation of the enzyme when incubated for one hour at $\text{pH} = 4.87$ and 20° . Still longer incubation times cause stronger inactivation as can be seen from Table 3: 2 ml enzyme were incubated with 0.51 mg NaDS at $\text{pH} = 4.87$ and the activity was estimated as above. Although the initial reaction rate after long incubation with NaDS is very low, the hydrolysis of the substrate reaches the normal value, indicating that after mixing of enzyme, NaDS and substrate no further inactivation takes place.

Table 3

Incubation time hrs	Initial velocity $k \cdot 10^3$	Hydrolysis (percent glucose) after 120 hrs
0	10	28.8
1	5	28.5
2	4	27.1
3	2.8	—
5.5	1.6	26.0

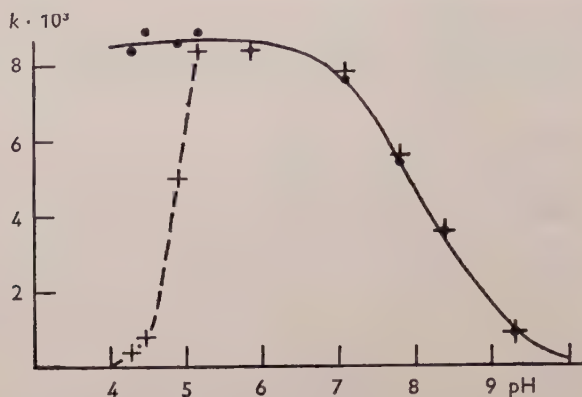


Fig. 2. Dependence of inactivation on pH.

Dependence of inactivation on pH. 2 ml enzyme solution were incubated for one hour at 20° with 0.5 ml acetate buffer, 0.51 mg NaDS and water to 4 ml. Activity determinations in Table 4. It appears that at pH = 5.1 and above no inactivation takes place but below pH = 5 the inactivation curve falls very steeply (Fig. 2) so that complete inactivation is reached already at pH = 4.5. This result is in complete agreement with that found in experiments with the same enzyme and heparin: both inhibitors are bound by the enzyme only below pH = 5. As pointed out in the previous paper, it does not seem permissible to assume simply that 5.0 is the isoelectric point of the enzyme protein, since several basic groups with varying basic strength are certainly present in the enzyme molecule, and the essential substrate-binding basic groups may not be identical with those having the greatest influence on the position of the isoelectric point.

Reversibility of inactivation. 2 ml enzyme were incubated with 0.51 mg NaDS at pH = 4.31 and 20° for one hour. The inactivation was complete when measured in starch solution at the same pH. If the activity determination was carried out at pH = 5.83, the enzyme was still inactive. In another experiment the enzyme was inactivated for one hour at pH = 4.31; 2 ml buffer

Table 4

pH during incubation	$k \cdot 10^3$	
	without NaDS	0.51 mg NaDS
9.30	0.9	0.9
8.40	3.6	3.6
7.80	5.4	5.5
7.09	7.6	7.8
5.85	8.2	8.2
5.14	8.9	8.4
4.92	8.3	5.0
4.48	9.0	0.4
4.31	8.2	0.2

Table 5

mg NaDS	g NaCl	$k \cdot 10^3$
0	0	4.2
0.51	0	0.16
0.51	0.3	0.25
0.51	0.6	0.39

of $\text{pH} = 8$ were added and after one hour activity was measured. The enzyme was quite inactive. Other experiments with other buffers gave the same result. We may therefore conclude that β -amylase, once inactivated below $\text{pH} = 5$, can not be reactivated by treatment with buffers above $\text{pH} = 5$. The result is essentially the same as that found with heparin even if in the case of heparin a slight reactivation could be observed.

The inactivation of β -amylase by heparin in acid solution is completely abolished, if buffer salts or neutral salts like sodium chloride are present in high concentration during incubation of enzyme and inhibitor. About 0.5 percent sodium chloride was sufficient to prevent the action of an amount of heparin which would otherwise have caused almost complete inactivation. The action of sodium chloride on the inactivation by NaDS was investigated in experiments of the type illustrated in Table 5. In all experiments, 2 ml enzyme solution, 0.5 ml buffer of $\text{pH} = 4.31$ and water to a total volume of 4 ml were incubated for one hour at 20° .

A certain action is observed, but the protection by the rather high concentrations of sodium chloride used is very small compared to the strong action of much lower concentrations in the case of the heparin inactivation. This may indicate that in the combination of enzyme and heparin, other forces are involved, at least partly, than in the combination of enzyme and dodecyl sulfate ion. Or it might be that the action of sodium chloride is primarily an action on the heparin molecule, presumably by the sodium ions, an action which must be assumed to be less pronounced in the case of dodecyl sulfate ion.

Protection by substrate and maltose. That presence of substrate protects the enzyme strongly against the NaDS action is evident from the experiments recorded in Table 1. An amount of NaDS, at least ten times as large as that needed for complete inactivation after incubation, was found to have only a slight action if the enzyme was added to the substrate-inhibitor-buffer mixture. The same was found also in the case of heparin.

The protecting action of maltose was investigated in the following experiments:

- 2 ml enzyme + 0.5 ml buffer ($\text{pH} = 4.31$) + 0.5 g maltose + water to 4 ml. After one hour incubation the activity was determined: $k = 0.0129$.
- Enzyme, buffer and water as in a), no maltose, 0.51 mg NaDS. After one hour the enzyme was quite inactive.
- same as in b) but 0.5 g maltose present. After one hour the activity was found to be $k = 0.0038$.

Evidently maltose has an appreciable protecting effect. Hardly any effect

of maltose was observed in the case of heparin which seems to support the view that in the enzyme-heparin combination, partly other groups of the enzyme molecule are involved than in the binding of dodecyl sulfate.

SUMMARY

Barley β -amylase is strongly inactivated by sodium dodecyl sulfate. Inactivation takes place only in acid solution below $\text{pH} = 5.1$. The enzyme, once inactivated in acid solution, is not reactivated at pH 's above 5.1, indicating that the inactivation is not simply a salt formation between basic groups of the enzyme and the dodecyl sulfate ion. The inactivation by dodecyl sulfate, in contrast to that by heparin, is only slightly affected by sodium chloride. Substrate and maltose protect the enzyme against the action of dodecyl sulfate, indicating that substrate-binding basic groups are involved in the attachment of the dodecyl sulfate ion.

REFERENCES: 1) Myrbäck, K., Arkiv Kemi 3, 437 (1952). — 2) Lundgren, A. P., Advances in Protein Chem. 5, 305 (1949). — 3) Putnam, F. W. and Neurath, H., J. Am. Chem. Soc. 66, 1992 (1944). — 4) Pankhurst, K. G. A., Bull. Soc. Chim. Biol. 31, 703 (1949). — 5) McMeekin, T. L., Polis, B. D., Della Monica, E. S., and Custer, J. H., J. Am. Chem. Soc. 71, 3606 (1949); Groves, L. M., Hipp, N. J., and McMeekin, T. L., *ibid.* 73, 2790 (1951). — 6) Hughes, D. E., Biochem. J. 46, 231 (1950). — 7) Gustavson, K. H., Acta Chem. Scand. 4, 1171 (1950). — 8) Teresi, J. D. and Luck, J. M., J. Biol. Chem. 194, 823 (1952).

Institute for Organic Chemistry and Biochemistry, University, Stockholm.

Tryckt den 10 november 1952.

Uppsala 1952. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

Proteolytic activity in sea urchin gametes

II. Activity of extracts and homogenates of the egg subjected to different treatments

By GUNNAR LUNDBLAD

With 1 Figure in the text

RUNNSTRÖM (45, 46) suggested that the initiation of the development of the egg after fertilization is due to an activation of enzyme systems. The proteolytic enzyme group seems to be of importance here. It is known that in embryonal and neoplastic tissues proteinases are always likely to occur. These intracellular enzymes are generally activated by thiols (cf. KREBS (24)) which play a great role in the processes of cell division and cell growth as reported by RAPKINE, HAMETT, VOEGTLIN, BRACHET, their co-workers and others. Therefore, it is of great interest to study the influence of thiol groups on the fertilization of the sea urchin egg. By means of moniodoacetate RUNNSTRÖM (44) showed that thiol groups do not seem to play a role in the fertilization process. Furthermore RUNNSTRÖM and KRISZAT (47) recently found that thiol inhibitors such as iodoacetamide, iodobenzoic acid and p-chloromercuribenzoate do not inhibit the penetration of the spermatozoon into the egg nor the membrane elevation, but do inhibit subsequent process in the egg. This might indicate that thiol enzyme is liberated in the egg *after* fertilization but does not necessarily play a role *at* fertilization. It is of interest to compare these observations with investigations by WALDSCHMIDT-LEITZ (51), MYRBÄCK (38) and others on the activation process in the germinating grain, where the latent barley amylase becomes active. These authors have by means of treating the barley flour with proteolytic enzymes — especially papain — attained a liberation of amylase, which actually might be a kind of artificial germination. MYRBÄCK (39) showed later that the latent β -amylase in the barley is bound at highmolecular insoluble protein and can only be liberated by proteolytic enzymes. It may be appropriate to give a short survey of vegetal proteinase activity which is more studied than the activity in the animal field. LINDERSTRÖM-LANG and co-workers (27, 36) found proteolytic enzymes in green malt and so did MOUNFIELD (37) in sprouted wheat. BALLS and HALE (1) investigated wheat proteinase of papain type, inactivated by oxidizing agents and reactivated by cysteine. LABARRE and PFEFFER (25) studied the enzymes of the grain of *Vicia faba* during growth and showed that the proteases have their maxi-

imum activity at about the 8th day of germination. ROCA and ONDARZA (43) found proteolytic activity during germination of kidney bean to reach a maximum on the 7th day, the optimum pH being 8. MERGENTIME and WIEGAND (34) demonstrated the presence of a proteolytic enzyme with an optimum pH about 5.5 in green peas. That enzyme was independent of thiol reagents. In growing *Avena* and *Pisum*, THIMANN and BONNER (49) reported a thiol dependent enzyme. In seeds of yellow peas DANIELSSON (5, 6) isolated a proteinase with pH optimum at 6.7 splitting gelatin. Unripe seeds possessed higher activity than did germinated.

In extracts from hen's embryos taken on the 10th brooding-day BORGER and PETERS (4) found proteolytic activity, the pH optimum being 4.0 and recently EMANUELSSON (7) reported the presence of three proteinases in hen's egg yolk. Glycerol-water extracts were used in both these cases.

The occurrence of proteolytic enzymes in sea urchin gametes and an increased proteolytic activity in the egg shortly after the fertilization has been reported earlier by the present writer (28, 29, 30). Woodward (53) who demonstrated proteolytic activity in cytoplasmic granules, obtained from unfertilized *Arbacia* eggs by fractional centrifugation, also found proteolytic enzymes in the eggs of the clam, *Macra solidissima* (54). In homogenates from *Psammechinus miliaris* — gastrulae stage — GUSTAFSON and HASSELBERG (12) found proteolytic activity when using hemoglobin as substrate, the pH optimum being about 4. They also reported the occurrence of a cathepsin II hydrolyzing l-benzoylargininamide in homogenates from different sea urchins. This activity was very weak or missing up to the mesenchymeblastula stage (11 hours). Thereafter a strong rise occurs. The activity was measured at pH 5.1.

It is known that treatment of sea urchin egg with hypertonic salt solutions as well as with calcium (cf. review of RUNNSTRÖM (46)) causes a kind of activation of the egg, i. e. artificial parthenogenesis. The effect of this treatment on the proteolytic enzymes was therefore studied by the present writer. The action of cysteine, of some enzyme inhibitors and of a couple of proteolytic enzymes upon extracts from lyophilized eggs or fresh egg homogenates have also been subject for investigations. These experiments are also included in this paper. Only the proteolytic enzymes with optimum activity at pH between 6 and 7 are considered in this work. It has been considered appropriate to publish these results despite their incompleteness. The work will be continued and the results will be further elaborated. It may be pointed out that the biological variation of the material is considerable. It is possible to demonstrate and influence the proteolytic activity only for a short period in the life of the unfertilized egg.

Material and experimental methods

Material from the sea urchin species *Paracentrotus lividus* and *Arbacia lixula* was collected at the Zoological Station in Naples and from the species *Echinus esculentus* at the Zoological Station, Kristineberg on the Swedish West Coast. The work was carried out in these places and in this Institute during the years 1949–51. Material from unfertilized eggs, but in a few cases also from fertilized eggs, was investigated. Extracts from lyophilized eggs as well as homogenates from fresh eggs were studied.

Frozen and dried material. The lyophilized material stored at -20°C was generally extracted with distilled water for about 15 hours at $+3^{\circ}\text{C}$, including freezing and thawing, and then cen-

trifuged at 5–10 000 rpm. in an angle centrifuge. In some cases a short extraction — about 4 hours — at $+3^{\circ}$ without freezing was made. When the extracts were dialysed this procedure was carried out for about 20 hours with stirring at $+3^{\circ}$ and subsequent dialysis if necessary.

Fresh material. The eggs from *Paracentrotus lividus* and *Echinus esculentus* were prepared in the ordinary way by taking out the rinsed ovaries but the *Arbacia lixula* material was prepared by injection of 0.5 ml 0.5 M potassium chloride according to TYLER (50). If not otherwise reported the material was treated as follows. The eggs were first washed 3 times with sea water, each time being left to spontaneous sedimentation at the temperature of the running fresh sea water. Then the eggs were washed with isotonic sodium chloride solution 2–3 times, carefully centrifuged and homogenized by suspending in distilled water and sucking and blowing through a narrow pipette. Then the homogenate was centrifuged and the activity measured directly or after special treatment. In a few series of experiments — on fertilization — the fresh egg material was shellfrozen, thawed, centrifuged and measured.

Measurement. If the homogenate or extract was measured directly, 1.00 ml was mixed with 3.00 ml of a 4.00 per cent gelatin solution (Fischer Sc. Co), buffered with imidazol (35) and containing 0.005 per cent merthiolate (Lilly) as sterilizer. If on the other hand, homogenates or extracts were treated before the activity was measured, 1.00 ml was mixed with 0.50 ml of the agent. This mixture was incubated for a certain time, after which 3.00 ml of the gelatin was added. The concentration of an agent, when indicated in a Table, is that occurring in the *incubation* mixture. The measurements were carried out at 35.5° C and the activity determined viscosimetrically and calculated according to a formula by Hultin (17) as earlier described (30). *The activity is expressed in this paper as m μ A which means one Hultin unit: $A \cdot 10^{-9}$.*

Results

Table 1

General survey of extracts and homogenates

Preparation	Material	State and age of material at extraction	Extraction		Dialysis		mgN/ml
			Medium	Time in hours	Medium	Time in hours	
AS 1	<i>Arbacia sperma</i>	L 7 months	H ₂ O	6	SW	24	0.37
AS 4	»	L 10 »	»	3	SW	20	0.57
AS 5	»	L 1 year	»	4	SW	20	0.12
AS 47	» Inj.	FT Fresh	»	120	—	—	1.27
AL 31	» egg NF	L 7 months	»	4	SW	24	0.65
AL 51	» » NF	L 7 »	»	4	SW	30	0.63
AL 52	» » NF	L 7 »	»	4	H ₂ O	30	0.67
PL 31	<i>Paracentrotus</i> egg NF	L 3 »	»	4	SW	30	0.55
PL 32	» » NF	L 3 »	»	4	H ₂ O	30	0.51
AL 62	<i>Arbacia</i> egg NF	L 5 days	»	4	H ₂ O	24	0.54
AL 91	» » NF	L 5 »	»	4	SW	36	0.37
AX 14	» » NF Batch 203	L 4 months	»	4	H ₂ O	24	0.59
AX 171	» » NF » 209	L 7 »	»	4	—	—	0.58
AX 172	» » NF » 209	L 7 »	» + Cy	4	—	—	0.44
AX 173	» » NF » 209	L 7 »	M KCl	4	—	—	0.65
AX 174	» » NF » 209	L 7 »	» + Cy	4	—	—	0.50
AX 18	» » NF » 209	L 8 »	H ₂ O	4	H ₂ O	20	0.091

G. LUNDBLAD, *Proteolytic activity in sea urchin gametes. II*

Table 1 (Cont.).

Preparation	Material	State and age of material at extraction	Extraction		Dialysis		mgN/ml
			Medium	Time in hours	Medium	Time in hours	
AX 19	<i>Arbacia</i> egg NF Batch 203	L 8 months	H ₂ O	4	H ₂ O	20	0.081
AX 20	» » NF » 209	L 9 »	» FT	20	FS	24	0.070
AX 21	» » NF » 209	L 10 »	» FT	15	FS	22	0.096
AX 23	» » NF » 209	L 10 »	NaCl 3.6 %	FT 15	NaCl 3.6 %	15	0.19
AX 242	» » F 50'	L 11 »	FS FT	15	FS	24	0.39
AX 221	» » NF Batch 209	L 11 »	H ₂ O FT	15	FS	20	0.11
AX 222	» » NF » 209	L 11 »	»	15	FS	20	0.11
AX 223	Residue from AX 221-2	— —	» FT	3	FS	20	0.069
AX 224	» » 221-2	— —	»	3	FS	20	0.064
PaX 111	<i>Paracentrotus</i> egg NF	Fresh	SW FT	—	—	—	1.82
PaX 112	» » F 5'	»	SW FT	—	—	—	2.32
PaX 131	» » NF	»	SW FT	—	—	—	1.26
PaX 132	» » F 9'	»	SW FT	—	—	—	1.67
PaX 133	» » F 30'	»	SW FT	—	—	—	2.81
PaX 14	» » NF	H Fresh	H ₂ O FT	—	—	—	—
AX 52	<i>Arbacia</i> egg NF Inj.	H »	»	—	—	—	—
AX 53	» » NF »	H »	»	—	—	—	—
AX 54	» » NF »	H »	»	—	—	—	1.95
AX 55	» » NF »	H »	»	1½	—	—	—
AX 56	» » NF »	H »	»	1	—	—	—
AX 57	» » NF »	H »	»	—	—	—	—
AX 58	» » NF »	L 15 days	H ₂ O	5	—	—	1.16
AX 58R	Residue from AX 58	»	» FT	15	—	—	0.20
AX 58D	AX 58	»	—	—	H ₂ O	22	0.69
AX 59	<i>Arbacia</i> egg NF Inj.	H Fresh	H ₂ O	½	—	—	—
AX 60	» » NF »	H »	»	½	—	—	—
AX 62	» » NF » No jc	H »	» FT	½	—	—	7.42
AX 63	» » NF » » »	H »	» FT	½	—	—	8.20
AX 66	» » NF » » »	H »	»	1	—	—	—
AX 67	» » NF » » »	H »	»	1	—	—	—
EcX 5	<i>Echinus</i> esc. egg FN » »	H »	»	½	—	—	—
EcX 6	» » » NF » »	H »	»	½	—	—	3.16
EcX 121	» » » NF » »	Fresh	SW FT	½	—	—	4.16
EcX 122	» » » F 18' No jc	»	SW FT	½	—	—	2.73

Explanations to table 1.

NF: unfertilized eggs

F 5' etc.: eggs shellfrozen 5 etc. minutes after fertilization (full membrane elevation)

L: lyophilized material

H: homogenate

SW: sea water

FS: 0.9 per cent sodium chloride solution

FT: material frozen and thawed

Inj.: the gametes were collected by injection of 0.50–1.00 ml 0.5 M KCl into the sea urchin
jc: jelly coat

For all lyophilized material the dry weight extracted was 2.5 per cent, except for AS which was 5.0 per cent.

Cy: cysteine

Increase of proteolytic activity in extract from lyophilized eggs after addition of cysteine or calcium

The influence of calcium is shown in Tables 2 and 3 and the influence of cysteine in Tables 3 and 4.

Table 2

Activation of extracts from unfertilized eggs from *Arbacia* and *Paracentrotus* through dialysis against sea water for 30 hours

AL 51-52: Lyophilized, unfertilized *Arbacia* eggs, stored 7 months, were extracted in distilled water 4 hours, centrifuged and dialysed against sea water respectively distilled water for 30 hours.

PL 31-32: Lyophilized, unfertilized *Paracentrotus* eggs, stored 3 months, were extracted in distilled water 4 hours, centrifuged and dialysed against sea water respectively distilled water for 30 hours.

One ml extract was mixed with 3.00 ml gelatin at pH 6.5 and measured.

Exp No	Egg extract		Dialysis medium	mμA/ml	mμA/mg N	Rel. activity per	
	Prep	mg N/ml				ml	mg N
1	AL 51	0.63	Sea water	0.55	0.87	1.57	1.67
2	AL 52	0.67	Dist. »	0.35	0.52	1.00	1.00
3	PL 31	0.55	Sea »	0.46	0.84	2.09	1.95
4	PL 32	0.51	Dist. »	0.22	0.43	1.00	1.00

As it seemed to be of great interest the effect of calcium was tried in several experiments. By means of calcium, activity appeared in some extracts, in which primary activity was completely absent. Table 2 shows that the proteolytic activity in extracts from *Arbacia* as well as from *Paracentrotus* is increased 50-100 per cent through dialysis against sea water. This activation may be due to the presence of calcium in the sea water.

The effects of calcium and of cysteine were tried in a series of experiments which are shown in Table 3. It is evident that calcium has an activating effect upon extracts from unfertilized *Arbacia* eggs. The influence of cysteine upon the activity is very strong, and the difference in activity between that of untreated extract and the cysteine treated extract is about the same as the difference between unfertilized and fertilized *Paracentrotus* eggs, 5 minutes stage (cf. Table 11 experiments 60-61) or the results given in Fig. 2 in an earlier paper (30). Calcium does not further increase the high activity obtained with cysteine. On the contrary, the presence of both calcium and cysteine results in lower activation than with cysteine. In Table 15 (experiments 87 and 91) we find that homogenate treated with calcium cannot be activated to the same extent with cysteine as that treated without calcium.

The experiments in Table 4 show that the presence of cysteine causes an increase of the activity in the water extract, but a decrease in the KCl extract. The reason for this is not yet known, but it may be possible that at the KCl extraction another type of enzyme is obtained. (cf. Table 5).

One month later a new extract was made from the same material as AX 171, but this extract, called AX 18, was inactive and it was not possible to activate it with

Table 3

Increase of the proteolytic activity in extracts from lyophilized unfertilized *Arbacia* eggs with calcium and cysteine

AL 52: Same extract as in Table 2.

AL 62: Fresh, lyophilized eggs were extracted in distilled water for 4 hours, centrifuged and dialysed against distilled water for 24 hours.

AX 14: Lyophilized eggs, stored 4 months, were extracted in distilled water 4 hours, centrifuged and dialysed against distilled water for 24 hours.

One ml extract was incubated with 0.50 ml agent for 2 hours at 20° C and then mixed with 3.00 ml gelatin.

Exp No	Egg extract		Agent Conc.	pH in mixture	mμA/ml	mμA/mg N	Rel. activity	Note
	Prep	mgN/ml						
5	AL 52	0.67	H ₂ O	7.1	0.89	1.33	1.00	No incub.
6	AL 52	0.67	CaCl ₂ 0.1 M	7.1	1.53	2.28	1.71	
7	AL 52	0.67	»	7.1	1.73	2.58	1.94	
8	AL 62	0.54	H ₂ O	6.6	0.60	1.1	1.00	
9	AL 62	0.54	Cysteine, HCl 0.005 M	6.6	4.4	8.1	7.3	
10	AX 14	0.59	H ₂ O	6.6	3.84	6.51	1.00	
11	AX 14	0.59	CaCl ₂ 0.1 M	6.6	9.96	16.9	2.59	
12	AX 14	0.59	Cysteine, HCl 0.003 M	6.6	57.8	98.0	15.1	
13	AX 14	0.59	Do + CaCl ₂ 0.1 M	6.6	35.2	59.7	9.17	0.50 ml of each

Table 4

Influence of cysteine during the extraction of unfertilized *Arbacia* eggs

AX 171: Unfertilized *Arbacia* eggs, lyophilized and stored 7 months (called Nr 209) extracted 4 hours with distilled water and centrifuged.

AX 172: Same as AX 171 but 18 mg cysteine added before the extraction (=0.01 M).

AX 173: Material Nr 209 extracted 4 hours with M KCl¹ and centrifuged.

AX 174: Same as AX 173 but 18 mg cysteine added before extraction.

Reaction mixture: 1.00 ml extract and 3.00 ml gelatin, pH=6.4.

Exp No	Egg extract		mμA/ml	mμA/mgN	Rel. activity per	
	Prep	mgN/ml			ml	mgN
14	AX 171	0.58	3.40	5.86	1.00	1.00
15	AX 172	0.62	9.40	15.2	2.76	2.59
16	AX 173	0.65	15.2	23.4	1.00	1.00
17	AX 174	0.69	6.9	10.0	0.45	0.43

cysteine. Also from the material nr 203 which 4 months earlier had given the active extract AX 14 (Table 3), it was now impossible to get an active extract by means of 4 hours extraction (AX 19). Therefore a prolonged extraction including freezing and thawing (material nr 209) was tried and this extract AX 20 was active as can be seen in Table 5.

¹ According to A. E. MIRSKY, Science, 84, 333 (1936).

The influence of freezing and prolonged extraction upon the activity of lyophilized egg extracts

The lack of proteolytic activity, which appeared in the extracts after a certain time of storage of the egg material, when this was extracted only a couple of hours at $+3^{\circ}\text{C}$ was the reason why another kind of extraction was tried. The activity of this extract and the influence of cysteine is shown in Table 5. The direct action of the freezing and thawing upon the extraction can be seen in Table 6. The influence of freezing and thawing upon the activity of extracts was also tried with lyophilized eggs from different stages and the result is shown in Table 7.

Table 5

Active extracts from unfertilized *Arbacia* eggs by freezing and prolonged extraction

AX 20: Lyophilized eggs, stored 9 months in the ice box, were suspended in distilled water, frozen, thawed, kept in the cold for 24 hours, centrifuged and dialysed against 0.9 per cent sodium chloride for 24 hours.

Reaction mixture: 1.00 ml extract was incubated 1 hour at 20°C with 0.50 ml agent and then mixed with 3.00 ml gelatin and measured.

Exp No	Egg extract		Agent Conc.	pH in mixture	m μ A/ml	m μ A/mgN	Rel. activity
	Prep	mgN/ml					
18	AX 20	0.070	H ₂ O	7.3	10.8	154	1.00
19	AX 20	0.070	Cysteine, HCl 0.003 M	7.2	2.5	36	0.23
20	AX 20	0.070	H ₂ O	6.9	12.2	174	1.00
21	AX 20	0.070	Cysteine, HCl 0.003 M	6.9	2.1	30	0.17
22	AX 20	0.070	NaF 0.003 M	6.9	12.2	174	1.00
23	AX 20	0.070	Cystine, HCl 0.003	6.9	9.4	134	0.77
24	AX 20	0.070	I ₂ -KI 0.0003 M	6.9	11.7	167	0.96

The results in Table 5 show that the proteolytic activity in the extract AX 20, obtained by freezing, thawing and prolonged extraction was decreased in the presence of cysteine, contrary to the extracts in Table 3. Thus the type of enzyme is different, apparently not dependent of sulfhydryl groups for its activity, but more resistant to long storage than the type, which appears in AL 62, AX 14 etc. Sodium fluoride and iodine have no influence upon the activity. In order to facilitate the discussion of these enzymes, we may call them E I (in extract AX 14) and E II (in extract AX 20). The activity of E I can be increased by cysteine, that of E II, on the contrary, decreased.

In order to find out whether the activity obtained by the freezing-thawing extraction is connected with a process in the supernatant or in the residue of the extract the experiments in Table 6 were performed.

The experiments in Table 6 show that the freezing and thawing of the supernatant (dissolved enzyme) does not influence the activity, but that freezing and thawing of undissolved material increases the proteolytic activity, which may be due either to a break down of granules (mitochondria) or to an increase in dissolved proteins.

Table 6

Influence of freezing and thawing upon the extraction of unfertilized *Arbacia* eggs

Arbacia eggs were extracted with distilled water for 12 hours and centrifuged. The supernatant was divided in two parts: AX 221 was frozen and then thawed up and AX 222 was kept in the cold for the same time. The undissolved part was suspended in distilled water and divided in two parts: AX 223 was frozen and thawed up and AX 224 stood in the cold the same time. Both were then centrifuged and the 4 extracts were dialysed for 20 hours against physiological saline.

Reaction mixture: 1.00 ml extract and 3.00 ml gelatin. pH 6.8.

Exp No	Egg extract		Treatment at extraction	mμA/ml	mμA/mgN	Rel. activity per	
	Prep	mgN/ml				ml	mgN
25	AX 221	0.11	Freezing-thawing	7.70	70.0	1.02	1.02
26	AX 222	0.11	Storage 3 hours at + 3° C	7.55	68.6	1.00	1.00
27	AX 223	0.069	Freezing-thawing	3.10	44.9	1.77	1.64
28	AX 224	0.064	Storage 3 hours at + 3° C	1.75	27.3	1.00	1.00

Table 7

Activity in extracts from different stages. Fractionated extraction

Lyophilized *Arbacia* eggs, stored 1 month were extracted in distilled water at +3° C during 4 hours and then centrifuged. The extracts are called:

NF from unfertilized eggs

F 5' from fertilized eggs 5 minutes stage

F 40' from fertilized eggs 40 minutes stage.

The residue from these extractions were extracted in distilled water for 9 hours with freezing and thawing and then centrifuged and dialysed against distilled water for 25 hours.

Reaction mixture: 1.00 ml extract was mixed with 3.00 ml gelatin and measured, the pH being 6.7.

Exp No	Egg extract		mμA/ml	mμA/mgN
	Stage	mgN/ml		
<i>First Extraction</i>				
29	NF	1.05	0	0
30	F 5'	0.89	1.4	1.57
31	F 40'	1.10	0.6	0.55
<i>Second Extraction</i>				
32	NF	0.54	4.7	8.7
33	F 5'	0.17	8.3	48.8
34	F 40'	0.20	1.6	8.00

The expected increase in activity after fertilization can be seen in Table 7. The activity values after the second extraction are all higher than the corresponding at the first extraction.

Treatment of lyophilized egg extracts with some inhibitors

In tables 8, 9 and 10 the extracts are treated with some agents possessing or supposed to possess inhibiting effect upon proteolytic activity. The plasmin inhibitor was earlier used and the Soy bean (trypsin) inhibitor is a well known agent. The extract from a 50 minutes stage which was known to have low activity, could be expected to decrease the proteolytic activity. The sperm extract could be expected to possess either activating effect like papain (vide infra) or inactivating effect like trypsin (vide infra).

Table 8

Experiments on extracts from unfertilized *Arbacia* eggs with plasmin inhibitor (PI) and hydrogenperoxide

AX 20: Same extract as in Table 5. Hydrogenperoxid: 3 per cent.

Reaction mixture: 1.00 ml was incubated at 20° C with 0.50 resp. 1.00 ml of added substance and mixed with 3.00 ml gelatin. pH in all mixtures 6.9.

Exp No	Egg extract		Agent	Incub. time	mμA/ml	mμA/mgN	Rel. activity
	Prep	mgN/ml					
35	AX 20	0.07	0.50 ml H ₂ O	1 hour	12.2	174	1.00
36	AX 20	0.07	0.50 » PI	1 »	0	0	—
37	AX 20	0.07	0.50 » Albumin ¹	1 »	9.58	137	0.79
38	AX 20	0.07	1.00 ml H ₂ O	2 hours	8.0	114	1.00
39	AX 20	0.07	0.50 » » + + 0.50 ml PI	2 »	0	0	—
40	AX 20	0.07	0.50 ml H ₂ O ₂ + + 0.50 ml PI ²	1 hour	0.5	7	0.06
41	AX 20	0.07	0.50 ml H ₂ O + + 0.50 ml H ₂ O ₂	2 hours	17.8	254	2.23

The plasmin inhibitor is the preparation F 1 from bovine plasma, used in a previous communication (31). The complete inactivating effect of plasmin inhibitor is shown in Table 8. It is evident that this effect is only partly due to a general protein effect (exp. 37). Treatment of plasmin inhibitor with hydrogen peroxide has but a slight effect upon its inhibiting power. Treatment of the extract with hydrogen peroxide results in a fairly strong activation. These experiments (40 and 41) give similar results as those found for plasmin (cf. table 4 (31)). The activation by means of hydrogenperoxide is perhaps due to a destruction of an inhibitor present in the extract.

In Table 9 some additional experiments on inhibitors are shown. As an inactivating effect of an extract from a stage, at which the proteolytic activity was low, could be expected, an extract was made from lyophilized material, frozen 50 minutes after fertilization. Also Soy bean inhibitor was tested.

¹ A 5.0 % solution of fraction V.

² The PI was heated with H₂O₂ 1 h before add. to AX 20.

Table 9

Influence of Soy bean inhibitor, and of an extract from fertilized *Arbacia* eggs, taken 50 minutes after fertilization upon the activity of extracts from unfertilized *Arbacia* eggs

AX 21: Lyophilized, unfertilized *Arbacia* eggs, stored 10 months in dry state, were extracted 15 hours with freezing and thawing: the extract centrifuged and dialysed 22 hours against 0.9 per cent sodium chloride.

AX 23: Same as AX 21, but dialysis against 3.6 per cent sodium chloride for 25 hours.

AX 242: Lyophilized eggs, taken 50 minutes after fertilization and stored in dry state for 11 months were extracted in 0.9 per cent sodium chloride for 15 hours with freezing and thawing, centrifuged and dialysed for 24 hours against 0.9 per cent sodium chloride.

SBI: Soy bean inhibitor: 0.5 mg in 0.50 ml H₂O.

Reaction mixture: 1.00 ml extract was incubated with 0.50 ml of the agent for 1 hour at 20° C and then mixed with 3.00 ml gelatin. pH 6.8.

Exp No	Egg extract		Agent	mμA/ml	mμA/mgN	Rel. activity
	Prep	mgN/ml				
42	AX 21	0.096	H ₂ O	6.09	63.4	1.00
43	AX 21	0.096	AX 242	3.87	40.3	0.64
44	AX 242	0.39	H ₂ O	1.65	4.23	—
45	AX 21	0.096	SBI	0.45	4.7	0.07
46	AX 21	0.096	H ₂ O	14.7	153	1.00
47	AX 21	0.096	AX 242	7.8	81.3	0.53
48	AX 242	0.39	H ₂ O	2.1	5.38	—
49	AX 23	0.19	H ₂ O	33.9	178	1.00
50	AX 23	0.19	AX 242	15.8	83.2	0.47

As can be seen in Table 9 the extract from the 50 minutes stage reduces the activity about 50 per cent. The Soy bean inhibitor has strong inhibiting power.

The influence of proteolytic active sperm extracts upon egg extracts can be seen in Table 10. The experiments show that there is no visible activation of the proteolytic activity in extracts from unfertilized eggs. When the extracts are mixed immediately before measuring, the activity of the sperm extract seems to be unaffected, but when the extracts are incubated there is a strong decrease in the activity of the sperm extract and this effect derives, judging from the activity values, from the action of the egg enzyme. Later, in Table 15, the effect upon an egg homogenate is shown.

Increased activity of fertilized *Paracentrotus* eggs

The increase of activity occurring a few minutes after fertilization and earlier reported by the present writer (vide supra) was found in new experiments and the results are shown in Table 11.

The increase in proteolytic activity at fertilization is shown in two series of experiments in Table 11. These results are in agreement with those earlier demonstrated (cf. Fig. 2). As comparison some experiments were made on *Echinus esculentus*,

Table 10

Extracts from lyophilized unfertilized *Arbacia* eggs treated with extracts from lyophilized *Arbacia* sperma

AL 31: Lyophilized *Arbacia* eggs extracted for 6 hours at $+3^{\circ}\text{C}$ in distilled water and dialysed against synthetic sea water 3.8 per cent (cf. Hörstadius (21)), for 24 hours.

AL 52: Lyophilized *Arbacia* eggs extracted as AL 31 but dialysed against distilled water.

AL 91: Lyophilized *Arbacia* eggs extracted in H_2O at $+3^{\circ}\text{C}$ for 4 hours and dialysed for 36 hours against fresh sea water, 3.8 per cent.

AS 1, AS 4 and AS 5: Lyophilized *Arbacia* sperm extracted for 4 hours at $+3^{\circ}\text{C}$ in H_2O and dialysed for 24 hours against sea water. All extracts centrifuged before and after dialysis.

Reaction mixture: 0.50 ml egg extract was incubated with 0.50 ml sperm extract resp. H_2O , mixed with 3.00 ml gelatin and measured. In experiments 53, 56 and 58 0.50 ml sperm extract was incubated with 0.50 ml H_2O .

Exp No	Material			Incubation	pH in mixture	$\mu\text{A}/\text{ml}$	$\mu\text{A}/\text{mgN}$	Rel. activity per ml
	Prep	mgN/ml	Agent					
51	AL 31	0.65	H_2O	—	6.5	1.40	2.15	0.074
52	AL 31	0.65	Sperm extract	—	6.5	18.8	28.9	1.00
53	AS 1	0.37	H_2O	—	6.5	18.8	50.8	1.00
54	Al 52	0.67	H_2O	10' at 18°C	6.9	1.00	1.49	0.009
55	Al 52	0.67	Sperm extract	10' at 18°C	6.9	4.35	6.50	0.038
56	AS 4	0.57	H_2O	10' at 18°C	6.9	114	200	1.00
57	Al 91	0.37	H_2O	60' at 20°C	7.6	2.89	7.82	0.16
58	Al 91	0.37	Sperm extract	60' at 20°C	7.6	5.52	14.9	0.30
59	AS 5	0.12	H_2O	60' at 20°C	7.6	18.2	152	1.00

Table 11

Increase of the proteolytic activity at fertilization of *Paracentrotus* eggs

Paracentrotus eggs were treated with glycine (0.1 per cent in sea water) for 15 minutes, fertilized and shellfrozen at certain times after the membrane elevation. The unfertilized controls were frozen before the spermatozoa were added. Then the frozen material was thawed and centrifuged.

Reaction mixture: 1.00 ml extract was mixed with 3.00 ml gelatin, pH 6.7. The nitrogen value of the glycine is subtracted from the values of the extracts.

Exp No	Egg material		mgN/ml	$\mu\text{A}/\text{ml}$	$\mu\text{A}/\text{mgN}$	Rel. activity per	
	Prep	Stage				ml	mgN
60	PaX 111	Unfertilized	1.82	0.62	0.34	1.00	1.00
61	PaX 112	Fertilized 5'	2.32	28.8	12.4	46.5	36.5
62	PaX 112	» 5'	2.32	18.6	8.0	30.0	23.5
63	PaX 131	Unfertilized	1.26	2.00	1.59	1.00	1.00
64	PaX 132	Fertilized 9'	1.67	15.2	9.10	7.60	5.72
65	PaX 133	» 30'	2.81	10.4	3.70	5.20	2.33

which are shown in Table 28. There is an increase in activity 18 minutes after fertilization, which time is comparable with approximately the 5 minutes stage for species like *Arbacia* and *Paracentrotus*. In experiment 62 the extract was stored 48 hours at $+3^{\circ}\text{C}$.

The influence of cysteine, calcium, papain and some other agents upon homogenates from unfertilized eggs

Since activation by means of calcium or cysteine was possible in extracts from lyophilized eggs it seems appropriate to study these effects upon fresh material. A stronger activation could be expected since the material was not frozen or dried. Therefore the proteolytic activity of homogenates were studied in several experiments when circumstances made this possible. Not only the effect of cysteine and calcium was investigated, but also that of papain. It is known from investigations by Myrbäck and others (*vide supra*) that papain liberates amylase from barley flour. In order to try the influence of an untreated papain solution upon homogenates from *Paracentrotus* and *Arbacia* eggs, the experiments shown in Tables 12, 13 and 14 were performed. However it cannot be stated by these experiments whether the effects obtained are due to the influence of papain upon the homogenate or vice versa. We notice here and in all experiments with homogenates, the much stronger activity values than in extracts from lyophilized material. The influence of a sperm extract is shown in Table 15 and that of trypsin in Table 16 in which experiments, however, a very strong spontaneous activity occurs, as is also studied in Table 17. Ficin is used in Table 18 as agent during homogenization and the effect of glutathione can be seen in Table 19.

Table 12

Activation of *Paracentrotus* egg homogenate

PaX 14: *Paracentrotus* eggs were washed 3 times with sea water, the jelly coat abolished, the eggs then again washed with sea water and 2 times with isotonic sodium chloride. After centrifugation the eggs were homogenized in distilled water and the homogenate divided in 5 parts. Each part was mixed with the equal volume of resp. substance, incubated for $\frac{1}{2}$ hour at 18° C and then centrifuged.

Reaction mixture: 1.00 ml of this was mixed with 3.00 ml gelatin. pH 6.7.

The purpose of washing the eggs with isotonic sodium chloride is to get rid of two valent ions, which are supposed to interfere with subsequent treatment of the material.

Exp No	Egg material			mμA/ml	mμA/mgN	Rel. activity per	
	Prep	mgN/ml	Treatment of homogenate with			ml	mgN
66	PaX 14 A	2.73	H ₂ O	4.80	1.76	1.00	1.00
67	PaX 14 B	2.44	CaCl ₂ 0.0035 M	5.40	2.21	1.13	1.26
68	PaX 14 C	2.10	Cysteine, HCl 0.01 M	41.6	19.8	8.67	11.3
69	PaX 14 D	2.68	Papain 1 : 10	97.8	36.5	20.4	20.7
70	Papain 1 : 20	0.032	—	1.50	46.9	—	—
71	PaX 14 E	—	H ₂ O, freezing and thawing	0	0	—	—

The experiments in Table 12 show the strong activating power of cysteine upon the homogenate. Calcium has no definite influence. The mixture of papain and homogenate possesses a greater activity than does any one of the components. The activity of papain is 65 times higher after the influence of the homogenate than it was before.

Table 13

Treatment of homogenates from unfertilized *Arbacia* eggs with papain and cysteine

Arbacia eggs were washed 2 times with isotonic NaCl, centrifuged and suspended in H₂O. In each of 3 tubes, A, B and C, 5.00 ml of this homogenous suspension was taken. To A was added 5.00 ml papain and the mixture was homogenized by sucking and blowing through a narrow pipette. B and C were homogenized in the same way, after which was added in B 5.00 ml papain and in C 5.00 ml H₂O. In another tube D papain was mixed with the equal volume H₂O. The tubes were shaken and kept 2 hours at 18°C, then centrifuged and the activities measured. The homogenates were called AX 52 A—D. In experiments 72—75 1.00 ml of each was mixed with 3.00 ml gelatin. In experiments 78—79 1.00 ml of each C and D was incubated with 0.50 ml 0.01 M cysteine for 1 hour at 18°C. In experiments 80—81 AX 52 C had stood 4 days at +3°C before incubation 1 hour at 18°C with resp. H₂O or 0.01 M cysteine. In experiments 76—77 AX 52 A and B were stored for 2 hours at +3°C.

Exp No	Egg homogenate or papain			pH in mix- ture	mμA/ml	mμA/mgN	Rel. activity per	
	Prep	mgN/ml	Treated with				ml	mgN
72	AX 52 A ¹	1.94	Papain	5.8	414	213	318	338
73	AX 52 B	2.04	»	5.8	852	418	655	663
74	AX 52 C	2.08	H ₂ O	5.8	1.3	0.63	1.00	1.00
75	Papain	0.32	»	5.8	10.2	31.9	7.85	50.6
76	AX 52 A	1.94	Papain	6.5	392	202	302	320
77	AX 52 B	2.04	»	6.5	716	354	550	557
			The treated homogenate incubated with:					
78	AX 52 C	2.08	Cysteine	5.8	373	179	287	284
79	Papain ²	0.32	»	5.4	1750	3600	113	113
80	AX 52 C	2.08	H ₂ O	6.2	11.6	5.56	1.00	
81	AX 52 C	2.08	Cysteine	5.9	360	173	31.0	

The experiments 72–75 (in Table 13) show that when the homogenate is treated with a papain solution, an extraordinary strong increase in proteolytic activity occurs, compared with that of the components. When papain is added to the egg material before the homogenization, the activity is about half of that occurring when the papain is added after homogenization. The same relation also holds for these two extracts measured at pH 6.5 after 2 hours' storage at +3°C. If cysteine is added to the homogenate originally treated only with water (AX 52 C), there is also an extremely high activation. The experiments 78 and 81 are in good agreement. The activity of the cysteine treated papain solution is more than 100 times stronger than that of the untreated papain, as can be seen from experiments 75 and 79.

In weak alkaline medium the "activation" of the papain-homogenate mixture is very strong as can be seen in Table 14.

In order to find out whether extracts from spermatozoa has an activating effect upon the proteolytic activity of *Arbacia* homogenate, some experiments were carried out. One of this series is shown in Table 15. As can be seen the activity of the sperm

¹ In A papain was added before homogenization.

² The rel. activity in experiment 79 is referred to that in experiment 75.

Table 14

Homogenate and papain in alkaline solution

AX 56: *Arbacia* eggs were treated as usual, washed 3 times with isotonic NaCl, centrifuged, suspended in distilled water and homogenized. The material (AX 56) was divided in 2 parts and equal volumes A) H₂O and B) papain were added, whereupon it was incubated for 1 hour at 18° C. In another sample C was mixed equal volumes of papain and H₂O.

Exp No	Material			pH in mixture	mμA/ml	mμA/mgN	Rel. activity per	
	Prep	mgN/ml	Treated with				ml	mgN
82	AX 56 A	4.36	H ₂ O	7.4	3.3	0.76	1.00	1.00
83	AX 56 B	3.24	Papain	7.5	1 160	358	352	471
84	Papain	0.30	H ₂ O	7.5	10.8	36.0	3.27	47.4

Table 15

Treatment of homogenate from unfertilized *Arbacia* eggs with sperm extract respective calcium and subsequent addition of cysteine

AS 47: *Arbacia* sperms (KCl injection) suspended and washed 2 times in sea water, centrifuged, suspended in dist. water, frozen, thawed and extracted in the cold (+3° C) for 5 days and finally centrifuged.

AX 53: *Arbacia* eggs were washed with sea water, then with isotonic sodium chloride, centrifuged, suspended in dist. water and homogenized. From this suspension was taken 3 equal parts: A, B, and C. To A was added the same volume dist. water, to B AS 47, and to C 0.1 M calcium chloride. In another tube equal volumes of AS 47 and dist. water were mixed. The samples were left at +18° C for 1 hour, centrifuged and measured. In experiments 85–88, 1.00 ml of each sample was mixed with 3.00 ml gelatin. In experiments 89–92, 1.00 ml of each sample was incubated with 0.50 ml 0.01 M cysteine, HCl for 30 minutes at +18° C before mixing with 3.00 ml gelatin.

A^I=original activity. A^{II}=the activity after addition of dry cysteine (ca. 0.02 M) 9 hours after the start. pH^I=pH before and pH^{II}=pH after addition of cysteine. In experiments 89–92 the activities in the last column are referred to A^I in experiments 85–88.

Exp No	Egg homogenate or sperm extract			pH ^I	mμA ^I /ml	mμA ^I /mgN	pH ^{II}	mμA ^{II} /ml	mμA ^{II} /mgN	A ^{II} /A ^I
	Prep	mgN/ml	Treated with							
85	AX 53 A	1.94	H ₂ O	6.6	3.5	1.8	5.0	186	95.9	53.1
86	AX 53 B	2.26	Sperm extract	6.6	28.5	12.6	5.0	232	103	8.1
87	AX 53 C	1.50	CaCl ₂	6.6	0	0	5.0	58.8	39.2	—
88	As 47	0.58	H ₂ O	6.6	72	124	5.0	34.8	59.3	0.48
			Added substance	pH ^{II}						
89	AX 53 A	1.94	Cysteine, HCl	5.8	283	146				80.9
90	AX 53 B	2.26	»	5.8	62.4	27.6				2.2
91	AX 53 C	1.50	»	5.8	7.6	5.1				—
92	As 47	0.58	»	5.8	52.0	89.7				0.72

extract alone is higher than that of the mixture with homogenate. This is also the case when extracts from lyophilized eggs are treated with sperm extracts, see Table 10. Cysteine increases the activity of homogenate with or without calcium, but does not increase the activity of sperm extract. The different pH's of the series makes further conclusions hard to draw.

Table 16

Treatment during homogenization of *Arbacia* eggs with trypsin and cysteine

Arbacia eggs were treated as in Table 15. After centrifugation the eggs were suspended in distilled water, kept at $+3^{\circ}\text{C}$ for 1 hour and further homogenized by blowing through a narrow pipette. This homogenate is called AX 54. Equal parts of AX 54 were put in 3 tubes A, B and C. To A was added the same volume distilled water, to B trypsin (extract, 0.02 per cent dry weight, prep. from B. D. H.) and to C 0.01 M cysteine, HCl. In another tube was mixed equal volumes trypsin and distilled water. The samples were kept for 1 hour at $+18^{\circ}\text{C}$ then centrifuged and measured. pH in mixture 6.6.

Exp No	Material			m $\mu\text{A}/\text{ml}$	m $\mu\text{A}/\text{mgN}$	Rel. activity per	
	Prep	mgN/ml	Treatment during homogenization			ml	mgN
93	AX 54 A	2.21	H ₂ O	465	210	1.00	1.00
94	AX 54 B	2.17	Trypsin	540	249	1.16	1.19
95	AX 54 C	1.95	Cysteine	7.0	3.6	0.015	0.015
96	Trypsin	0.002	—	945	473·10 ³	2.03	—

The influence of trypsin is shown in Table 16. The activity of the trypsin solution is decreased about 40 per cent by the homogenate.

A striking fact is that in water-treated homogenate AX 54A, the proteolytic activity is about 100 times stronger than usual and that cysteine destroys about 98 per cent of this activity. This is a parallel to what happens to enzyme II, which appears at freezing and prolonged extraction (Table 5). This enzyme seems to be inactivated by cysteine¹, contrary to enzyme I which can be strongly activated by cysteine. The extremely strong activity of the homogenate AX 54A can thus derive from enzyme II, which seems to have been spontaneously activated during homogenization.

Table 17

Treatment of homogenized material with cystine, cysteine, and calcium

The same homogenate as in Table 16 (AX 54), centrifuged directly after homogenization and stored at $+3^{\circ}\text{C}$ for 19 hours. 1.00 ml homogenate was incubated with 0.50 ml of resp. agent for 1 hour at 20°C and then mixed with 3.00 ml gelatin. In experiment 97, AX 54 was stored only 14 hours and measured without incubation. pH 6.6.

Exp No	Material			m $\mu\text{A}/\text{ml}$	m $\mu\text{A}/\text{mgN}$	Rel. activity
	Prep	mgN/ml	Agent Conc.			
97	AX 54	1.95	Untreated, no incubation	1 060	543	95.5
98	AX 54	1.95	H ₂ O	11.1	5.69	1.00
99	AX 54	1.95	Cystine 0.0003 M	10.7	5.49	0.96
100	AX 54	1.95	Cysteine, HCl 0.003 M	173	88.7	15.6
101	AX 54	1.95	CaCl ₂ 0.1 M	19.3	9.90	1.74

These results are very peculiar. When the activity was high, as in experiment 93 (Table 16), treatment with cysteine almost abolished the activity. When it was low,

¹ The inactivating effect of cysteine seems to be of a complicated nature, cf. IRWING, FRUTON and BERGMANN (23) and MASCHMANN (32).

as in experiment 98, cysteine strongly increased the activity. The difference in activity between experiment 97 and 98 is remarkable, it seems as if the 1 hour incubation destroyed most of the activity, which is now partially restored by treatment with cysteine. Calcium has here a weak activating effect.

Because of the strong spontaneous activity of the extract AX 54 in Tables 16 and 17 the experiments with trypsin were repeated later. This time, as shown in Table 20, the egg material was only treated more systematically.

As can be judged from experiments 98-99, cystine does not diminish the base activity, which, if this be the case, is independent of sulphhydryl groups for its function.

Table 18

Arbacia homogenate and ficin

AX 57: *Arbacia* eggs were treated as usual. The uncentrifuged homogenate was divided in equal parts and incubated at 18° C for 1 hour with the same volumes of resp. agents. A: distilled water, B: 0.01 M cysteine, HCl and C: ficin (Merck, Rahway) 0.02 per cent. In another sample ficin and distilled water 1:1 were mixed and stored the same time. All samples were centrifuged. A^I: the activity at the start. A^{II}: the activity after adding 0.50 ml 0.01 M cysteine, HCl 2 hours after the start. pH=6.7 before and 6.6 after addition of cysteine.

Exp No	Material			mμA ^I /ml	mμA ^I /mgN	mμA ^{II} /ml	mμA ^{II} /mgN
	Prep	mgN/ml	Treated with				
102	AX 57 A	3.36	H ₂ O	0	0	2.67	0.79
103	AX 57 B	3.36	Cysteine	22.2	6.61	10.7	3.15
104	AX 57 C	3.42	Ficin	4 390	1 280	3 080	900
105	Ficin	0.028	H ₂ O	87.0	3 110	1 580	56.4 · 10 ³

As another enzyme of papain type the influence of the plant proteinase ficin was tested and the result is shown in Table 18. The homogenate, which in this preparation was inactive itself, could be activated by cysteine and gave a very strong activity when it was mixed with the ficin solution.

Table 19

Activation of jelly coat free *Arbacia* egg homogenate

AX 67: *Arbacia* eggs were washed 3 times with sea water, the jelly coats abolished, the eggs again washed with sea water and then 2 times with isotonic NaCl. After centrifugation they were homogenized in distilled water. The homogenate was divided in 4 parts and each part treated with equal volumes of resp. substances for 30 minutes at 18° C and then centrifuged. 1.00 ml treated homogenate was mixed with 3.00 ml. gelatin. pH in the mixtures 6.6.

Exp No	Material			mμA/ml	mμA/mgN	Rel. activity per	
	Prep	mgN/ml	Treatment of homogenate with			ml	mgN
106	AX 67 A	4.32	H ₂ O	2.0	0.46	1.00	1.00
107	AX 67 B	3.46	Cysteine, HCl 0.003 M	2.3	0.66	1.15	1.43
108	AX 67 C	3.80	Glutathione 0.003 M	5.4	1.42	2.70	3.09
109	AX 67 D	3.88	CaCl ₂ 0.001 M	2.2	0.57	1.10	1.24

Some activation experiments on jelly coat free egg homogenate are shown in Table 19. Cysteine and calcium have no definitive effect but glutathione gives more than the double original activity.

Influence of cysteine, papain and calcium upon homogenates from unfertilized eggs, treated with salt solutions of different strength

In Tables 20, 21, 22, 23 and 24 the egg material is before homogenization treated with salt solutions as hypertonic sea water and hypo-, iso-, or hypertonic sodium chloride solutions. The egg material is then homogenized and treated in the usual way. In Table 20 cysteine and trypsin are used during homogenization and in Table 21 the effect of KCN-activated as well as non-activated papain can be seen. The influence of papain is also studied in Table 22 and that of calcium upon homogenate from eggs treated with hypertonic sea water is shown in Table 23. Different treatment of eggs from *Echinus esculentus* is shown in table 24.

Table 20

Homogenates from *Arbacia* eggs differently washed. Treatment with trypsin and cysteine

AX 55: *Arbacia* eggs were washed 3 times in sea water, divided in 3 parts

AX 551—553 and then washed with sodium chloride:

AX 551: short (15') washing 2 times with 3.8 per cent sodium chloride

AX 552: long (1 1/2 h) washing 2 times with 3.8 per cent sodium chloride

AX 553: long (1 1/2 h) washing 2 times with 4.0 per cent sodium chloride

After this procedure the material was centrifuged and homogenized in distilled water. Experiments 110–114: One part of AX 551 was treated for 30 minutes at 18° C with resp. one part of A) distilled water, B) 0.01 M cysteine, HCl, C) trypsin and after that centrifuged.

1.00 ml sample was mixed with 3.00 ml gelatin. In experiment 114 the activity per mgN is referred to the trypsin nitrogen.

Experiments 115–116: AX 552 was first centrifuged and 1.00 ml then treated for 30 minutes at 18° C with resp. 0.50 ml H₂O or cysteine, HCl 0.01 M. Then mixed with 3.00 ml gelatin.

Experiments 117–118: AX 553 was first centrifuged and then treated as AX 552. pH in all mixtures 6.7.

Exp No	Material			mμA/ml	mμA/mgN	Rel. activity per	
	Prep	mgN/ml	Treated with			ml	mgN
110	AX 551 A	2.50	H ₂ O	6.4	2.56	1.00	1.00
111	AX 551 B	2.50	Cysteine	3.6	1.44	0.56	0.56
112	AX 551 C	2.66	Trypsin	360	135	56.3	52.7
113	Trypsin	0.002	H ₂ O	2 280	114 · 10 ⁴	356	1.00
114	AX 551 C	0.002	Trypsin	360	18 · 10 ⁴	—	0.16
115	AX 552	3.90	H ₂ O	4.71	1.21	1.00	
116	AX 552	3.90	Cysteine	35.6	9.13	7.56	
117	AX 553	5.50	H ₂ O	157	28.5	1.00	
118	AX 553	5.50	Cysteine	480	87.3	3.06	

It can be seen from Table 20 that the activity of trypsin is reduced in its mixture with homogenate. The activities of the water treated homogenates AX 551A

and AX 552, deriving from eggs, which are washed with isotonic sodium chloride for 15 minutes resp. 1 1/2 hour are both low (normal), but the homogenate AX 553 in which case the egg material was washed in slightly hypertonic (4.0 per cent) solution, possesses a rather high proteolytic activity, which is increased still more by cysteine. Thus this washing seems to liberate a part of the enzymic activity in the unfertilized egg. Further studies are presented in Tables 22 and 24.

Table 21
Activation of homogenate AX 552

In experiments 120–121 dry substance was added to AX 552, before mixing with gelatin. In experiments 122–125, 0.50 ml of resp. agent was added to 1.00 ml homogenate and incubated for 30 minutes at 18° C.

Exp No	Material			pH in mixture	mμA/ml	mμA/mgN		Rel. activity per	
	Prep	mgN/ml	Agent					ml	mgN _{pap}
119	AX 552	3.90	—	6.5	16.4	4.2		1.00	
120	AX 552	3.90	Cysteine, HCl 2 mg	6.3	123	31.5		7.5	
121	AX 552	3.90	KCN 2 mg	7.5	17.2	4.4		1.05	
						N _{h-g} ^(*)	N _{pap} ^(*)		
122	AX 552	3.90	H ₂ O	6.6	8.4	2.15	—	1.00	—
123	AX 552	3.90	Papain KCN act.	6.6	312	80.0	20 800	37.2	4.16
124	H ₂ O	—	» » »	6.6	306	—	20 400	—	4.08
125	AX 552	3.90	»	6.6	75.0	19.2	5 000	8.93	1.00

Two days after the preparation of the homogenates in Table 20, AX 553 was inactive but AX 552 still active. It seems to be significant that strong activities disappear after short time. Therefore homogenate AX 552 was used in Table 21, where the influence of papain and potassium cyanide is shown. The homogenate AX 552 is fairly strongly activated by cysteine (experiments 120–121) but hardly by potassium cyanide (the pH in that mixture is however one unit higher, which acts in opposite direction). The KCN treated papain has about the same activity if mixed with water or homogenate (experiments 123–124).

The untreated papain increases the activity of the homogenate about 9 times. These experiments seem to show that when papain is activated with KCN before adding to the homogenate no further activation occurs when the homogenate is treated with this papain. Cysteine could not be used in this case, because of its activating effect upon the homogenate.

Treatment of intact eggs with hypertonic solutions is a well known method to make artificial parthenogenesis and therefore the following experiments were performed. After the usual washings, but before the homogenization, the egg material was treated with resp. hyper-, iso- and hypotonic solutions of sodium chloride in order to see if these procedures had any influence upon the spontaneous activity of the

* N_{hg} = nitrogen in the homogenate; N_{pap} = papain nitrogen in the incubation solution (0.015 mg/ml).

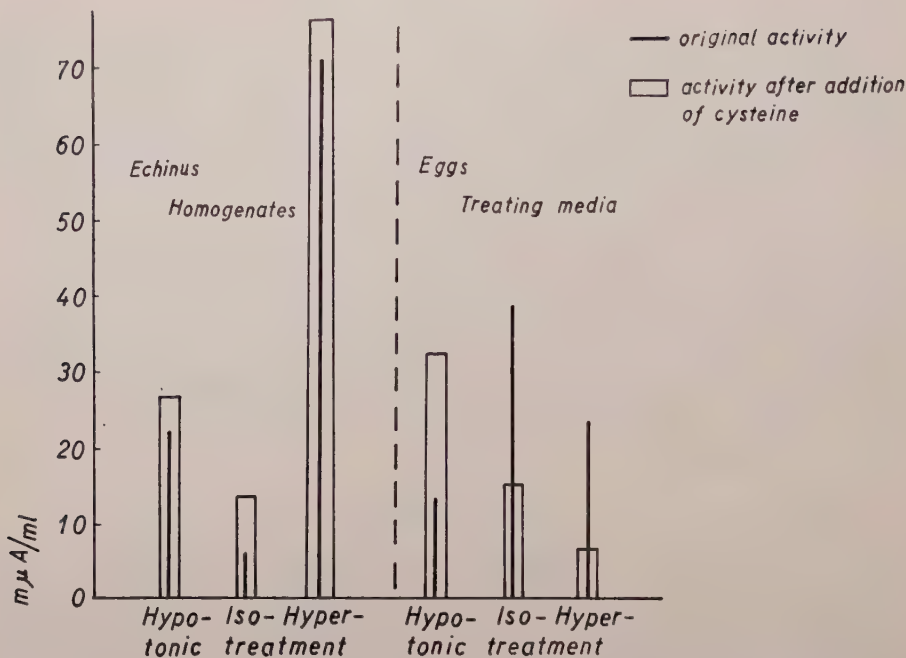
homogenates or upon their effect on papain. Table 22 shows that the homogenates have about the same weak, spontaneous activity, but that after addition of cysteine the hypertonic treated material is activated to a greater extent than the isotonic treated and still more than the homogenate from hypotonic treated material. The supernatants (i. e. the media) from the different egg treatments were inactive, but after addition of cysteine there appeared a rather strong proteolytic activity in the hypertonic solution. By mistake the isotonic solution was discarded. The influence of the homogenates upon papain is different. The hypotonic treated material has no activating effect upon papain, the hypertonic treated gives about 100 times the original activity of the papain and the isotonic, i. e. normal treated material gives about 10 times that activity. A part of the eggs treated with isotonic solution was homogenized at pH 2 (AX 59D). This homogenate was inactive and cysteine produced but a very weak activity, but its activating influence upon papain was still stronger than that of the hypertonic homogenate. The supernatant (the medium) from the hypertonic treatment activated the papain about 10 times.

Table 22

Homogenates from *Arbacia* eggs treated with hypo- and hypertoni

Arbacia eggs were treated as usual and divided in 3 parts. In A the eggs were left to sediment for 1 hour in 2.8 per cent NaCl (the supernatant AX 59 A sup. became light red), in B the eggs sedimented in 4.8 per cent NaCl (the supernatant is called AX 59 B sup.) and in the third part C-D the sedimentation occurred in isotonic NaCl. The eggs were then centrifuged and A, B, and C were homogenized in distilled water while D was homogenized in distilled water, acidified with HCl to pH 2. After half an hour the homogenates were centrifuged and measured. 1.00 ml homogenate was mixed with 3.00 ml gelatin. pH in the original mixture 6.6, pH in the mixture after adding of the cysteine 6.4. A^I: original activity, A^{II}: the activity after adding 0.50 ml 0.01 M cysteine 2 hours (experiments 126-129) resp. 1 hour (experiments 130-131) after the start.

Exp No	Material			MμA ^I ml	mμA ^I mgN	Rel. activity per		mμA ^{II} ml	mμA ^{II} mgN	Rel. activity per		A ^{II} A ^I
	Prep	mgN ml	Treatment Solution			ml	mgN			ml	mgN	
26	AX 59 A	2.62	Hypotonic	5.45	2.08	1.70	1.41	7.11	2.71	0.29	0.24	1.31
27	AX 59 B	2.55	Hypertonic	2.40	0.94	0.75	0.64	48.0	18.8	1.94	1.65	20.0
28	AX 59 C	2.16	Isotonic	3.20	1.48	1.00	1.00	24.7	11.4	1.00	1.00	7.72
29	AX 59 D	1.09	Isotonic and acid homogenization	0	0	—	—	2.84	2.61	0.11	0.23	
30	AX 59 A sup.	0.31	Hypotonic	0	0	—	—	0	0	—	—	
31	AX 59 B sup.	0.044	Hypertonic	0	0	—	—	45.3	1 030	—	—	
32	AX 59 A	2.62	Papain incuba- tion	27.6	10.5	0.09	0.07					
33	AX 59 B	2.55	»	3 700	1 450	11.8	10.1					
34	AX 59 C	2.16	»	312	144	1.00	1.00					
35	AX 59 D	1.09	»	5 450	5 000	17.5	34.7					
36	AX 59 A sup.	0.31	»	334	1 080	8.13	1.16					
37	AX 59 B sup.	0.044	»	41.1	934	1.00	1.00					



Homogenates from *Echinus* eggs treated with hypo-, iso-, and hypertonic solutions. See also Table 24.

Table 23

Homogenate from *Arbacia* eggs treated with hypertonic sea water

AX 66: *Arbacia* eggs were washed 3 times with sea water, the jelly coats abolished and the eggs washed with sea water again. Then the eggs were treated for 10 minutes with respective A) sea water + isotonic sodium chloride (3.8 per cent) and B) sea water + hypertonic sodium chloride (4.8 per cent) in proportions 1:1. The material was slightly centrifuged, washed 2 times with isotonic sodium chloride, centrifuged again and homogenized in distilled water. 1.00 ml homogenate was treated with 0.50 ml of respective agent for $\frac{1}{2}$ hour at 18° C and then mixed with 3.00 ml gelatin, pH 6.6.

Exp No	Material			mμA/ml	mμA/mgN	Rel. activity
	Prep	mgN/ml	Agent Conc.			
138	AX 66 A	8.20	H ₂ O	3.20	0.39	1.00
139	AX 66 A	8.20	CaCl ₂ 0,001 M	8.53	1.04	2.67
140	AX 66 B	1.81	H ₂ O	6.40	3.54	1.00
141	AX 66 B	1.81	CaCl ₂ 0.001 M	11.7	6.46	1.83

The influence of sea water plus isotonic resp. hypertonic sodium chloride upon the egg material before homogenization can be seen in Table 23. The values indicate that the hypertonic treatment contributes to the release of active enzyme in the

same direction as calcium. The great difference of nitrogen in the homogenates is due to different effects of the centrifugations. The homogenate from the hypertonic treated eggs sedimented easier than did the other (angle centrifuge ca. 2-3000 rpm.).

Table 24

Homogenates from *Echinus* eggs treated with hypo-, iso- and hypertonic solutions

EcX 5: *Echinus* eggs were washed 2 times with isotonic sodium chloride (3.2 per cent). The material was divided in 3 parts EcX 5A-5 C, slightly centrifuged and then left to sediment in respective solution for 30 minutes at +3° C. A: hypotonic (2.5 per cent), B: isotonic (3.2 per cent), and C hypertonic (4.0 per cent) sodium chloride. The material was centrifuged, the supernatants — called EcX 5A-5Csup. — collected and the sedimented eggs homogenized in distilled water for 30 minutes at 18° C, centrifuged and measured (EcX 5A-5C).

pH in the original mixture = 6.7, after addition of the cysteine = 6.4.

A^I: original activity, A^{II}: the activity after addition of 0.50 ml 0.01 M cysteine, HCl 3.5 hours (experiments 142-144) respective 4 hours (experiments 145-147) after the start.

Exp No	Material			$\mu\mu A^I$ ml	$\mu\mu A^I$ mgN	Rel. activity per		$\mu\mu A^{II}$ ml	$\mu\mu A^{II}$ mgN	Rel. activity per		A^{II}/A^I
	Prep	mgN/ ml	Treatment Solution			ml	mgN			ml	mgN	
442	EcX 5 A	7.52	Hypotonic	22.2	2.95	3.7	3.4	26.7	3.55	1.96	1.80	1.20
443	EcX 5 B	6.91	Isotonic	6.0	0.87	1.0	1.0	13.6	1.97	1.00	1.00	2.27
444	EcX 5 C	4.20	Hypertonic	70.2	16.7	11.7	19.2	75.8	18.0	5.57	9.14	1.08
445	EcX 5 A sup.	0.03	Hypertonic	13.2	440	0.35		31.7	1 060	2.19		2.40
446	EcX 5 B sup.	0.03	Isotonic	37.8	1 260	1.00		14.5	483	1.00		0.38
447	EcX 5 C sup.	0.03	Hypertonic	23.4	780	0.62		6.6	220	0.46		0.28

Echinus eggs were investigated in regard to the influence of hypo-, iso-, and hypertonic treatment of the material before the homogenization and the results are presented in Table 24. The hypertonic treatment gives a homogenate with a strong original activity, which is only a little increased by cysteine. The original activities in the other homogenates are much lower and only the isotonic treated homogenate is activated more than 2 times. Of the treating media (called EcX 5A-5Csup.), only the hypotonic solution, which has the lowest original activity, is activated by cysteine. The isotonic solution has the greatest original activity. The graph gives a better survey of these experiments.

An attempt to fractionated homogenization and homogenization through freezing and thawing

A preliminary investigation on the localization of the proteolytic activity in the egg is shown in Table 25. This procedure must, however, be repeated with different homogenization agents and by means of a more effective centrifugation. A homogenate obtained by freezing and thawing is the subject for some experiments in Table 26.

Table 25

Fractionated homogenization of *Arbacia* eggs

Arbacia eggs were washed 3 times with sea water and 3 times with isotonic sodium chloride. After centrifugation the eggs were homogenized in isotonic sodium chloride, kept for $\frac{1}{2}$ hour at 18° C and then centrifuged at about 8000 rpm. The supernatant is called AX 601. The sediment was homogenized in distilled water, kept for 1 hour at 18° and centrifuged. This supernatant is called AX 602. 1.00 ml homogenate was incubated for 30 minutes at 18° with respective agent (0.50 ml) and then mixed with 3.00 ml gelatin. pH=6.6 in the mixture.

Exp No	Material			m μ A/ml	m μ A/mgN	Rel. activity
	Prep	mgN/ml	Agent Conc.			
148	AX 601	2.48	H ₂ O	17.1	6.9	1.00
149	AX 601	2.48	Papain	2 080	840	12.2
150	AX 601	2.48	CaCl ₂ 0.1 M	55.5	22.4	3.25
151	AX 601	2.48	Cysteine, HCl 0.003 M	113	45.6	6.61
152	AX 602	3.02	H ₂ O	0	0	—
153	AX 602	3.02	Papain	1 330	440	—
154	AX 602	3.02	CaCl ₂ 0.1 M	0	0	—
155	AX 602	3.02	Cysteine, HCl 0.003 M	187	61.9	—

The two different extracts obtained at the fractionated homogenization are studied in Table 25. The first homogenization was made in isotonic sodium chloride to avoid the disintegration and dissolving of particles in the cytoplasm. The residue centrifuged down was then homogenized in distilled water. The first homogenate had an original activity which was increased more than 6 times by means of cysteine. Papain was activated and calcium increased the activity about 3 times. The second homogenate was inactive and could not be activated by calcium, but cysteine caused a stronger activity than in the first homogenate and the activation of papain was considerable, the activity of the untreated papain being about 10 m μ A/ml.

Table 26

Homogenization through freezing and thawing

Arbacia eggs were washed 3 times with sea water, the jelly coats abolished, then slightly centrifuged, washed one time with sea water and two times with isotonic sodium chloride. After centrifugation the material was suspended in H₂O, frozen, thawed and centrifuged immediately prior to use. AX 62 and AX 63 are from different batches but prepared in the same way. 1.00 ml homogenate was treated for $\frac{1}{2}$ hour at 18° with 0.50 ml of respective agent, mixed with 3.00 ml gelatin and measured.

Exp No	Material			pH in mixture	m μ A/ml	m μ A/mgN	Rel. activity
	Prep	mgN/ml	Agent Conc.				
156	AX 62	7.42	H ₂ O	6.5	3.4	0.46	1.00
157	AX 62	7.42	CaCl ₂ 0.001 M	6.5	96.0	12.9	28.2
158	AX 62	7.42	o-iodosobenzoic acid 0.0003 M	6.5	0	0	—
159	AX 63	8.20	H ₂ O	7.3	3.2	0.39	1.00
160	AX 63	8.20	CaCl ₂ 0.001 M	7.3	12.8	1.56	4.00
161	AX 63	8.20	CuCl ₂ 0.0003 M	7.3	0	0	—

The inactivating effect of o-iodosobenzoic acid and of copper ions, shown in Table 26 seems to suggest the existence of functional thiol groups in the enzyme. The effect of calcium at pH 6.5 (experiment 157) is extraordinarily strong and of the same order of magnitude as the effect of cysteine, reported in other experiments in this paper. Since only 3 viscosimeters were available at these experiments, the effect of cysteine could unfortunately not be tested.

Some investigations on fresh *Echinus* eggs

A homogenate from *Echinus* eggs with fairly strong proteolytic activity, which was supposed to be sulfhydryl dependent was treated with a sulfhydryl inhibitor in Table 27. The spontaneous activation occurring a short time after fertilization is shown in Table 28 and in Table 29 some experiments are made on this 18 minutes' extract.

Table 27

Inactivation of *Echinus* homogenate with iodoacetamide

EcX 6: *Echinus* eggs were washed 3 times with sea water at $+3^{\circ}$ (the jelly coats disappear spontaneously during the washings) and 3 times with isotonic sodium chloride. After careful centrifugation the eggs were homogenized in distilled water for 30 minutes at 18° and centrifuged. 1.00 ml homogenate was incubated 30 minutes at 18° with 0.50 ml of the agent. pH in the mixture = 6.7.

Exp No	Material			m μ A/ml	m μ A/mgN	Rel. activity
	Prep	mgN/ml	Agent Conc.			
162	EcX 6	0.32	H ₂ O	19.7	6.16	1.00
163	EcX 6	0.32	Iodoacetamide 0.0003 M	2.5	0.78	0.13

The results in Table 24 showed the activating influence of cysteine upon *Echinus* homogenates, indicating functional thiol groups and therefore a homogenate from *Echinus* was treated with iodoacetamide (cf. (47)) and this agent caused about 85 per cent inhibition as can be seen in Table 27.

Table 28

Increase of the proteolytic activity at fertilization of *Echinus* eggs

Echinus eggs were washed 3 times with sea water, treated for 10 minutes with a 0.1 per cent solution of glycine in sea water and fertilized. One part was frozen immediately and another 18 minutes after membrane elevation. The frozen material was thawed and centrifuged and measured. A^I: original activity, A^{II}: the activity after addition of dry cysteine, HCl (ca. 0.01 M in the mixture) 6 hours after the start. pH in the mixture = 6.7 before and 6.4 after the addition of the cysteine.

Exp No	Material			$\frac{m\mu A^I}{ml}$	$\frac{m\mu A^I}{mgN}$	Rel. activity per		$\frac{m\mu A^{II}}{ml}$	$\frac{m\mu A^{II}}{mgN}$	Rel. activity per		$\frac{A^{II}}{A^I}$
	Prep	mgN/ml	Stage			ml	mgN			ml	mgN	
64	EcX 121	4.16	Unfertilized	11.0	2.64	1.00	1.00	23.5	5.65	1.00	1.00	2.14
65	EcX 122	2.73	Fertilized 18 minutes	23.5	8.61	2.14	3.26	61.0	22.3	2.60	3.95	2.60

We notice the increase in activity 18 minutes after fertilization which time is comparable with about 5 minutes for species like *Arbacia* and *Paracentrotus*. In both extracts the activity was increased more than two times by cysteine, as can be seen in Table 28.

Table 29

Activity experiments with fertilized *Echinus* material

The 18 minutes extract EcX 122 was stored at $+3^{\circ}$ C for 24 hours and in each sample 1.00 ml was incubated for 30 minutes at 18° with 0.50 ml of respective agent, mixed with 3.00 m gelatin and measured, the pH being 6.6.

Exp No	Material			m μ A/ml	m μ A/mgN	Rel. activity
	Prep	mgN/ml	Agent Conc.			
166	EcX 122	2.73	H ₂ O	4.0	1.47	1.00
167	EcX 122	2.73	Cysteine, HCl 0.003 M	11.5	4.21	2.88
168	EcX 122	2.73	CaCl ₂ 0.001 M	12.0	4.40	3.00
169	EcX 122	2.73	Iodoacetamide 0.0003 M	0	0	—
170	EcX 122	2.73	Soy bean inhibitor 0.01 per cent	3.0	1.10	0.75

The experiments show that both cysteine and calcium activate to the same extent in this case. Iodoacetamide inactivates completely but the influence of SBI is doubtful.

Treatment of extract from fresh lyophilized egg material with papain, cysteine, and calcium

In Table 30 are shown some experiments made on extracts from fresh frozen and dried eggs. A kind of fractionated extraction is performed and the effect of cysteine, papain or calcium is studied.

As it seemed to be of interest to find out if also extracts from lyophilized eggs had a similar activating influence upon papain as possess homogenates, some experiments were made which are shown in Table 30. First, the material was extracted in the cold and a part of this extract AX 58 was dialysed against distilled water (AX 58D). Then the residue of the egg material was extracted again, this time with freezing and thawing (AX 58R). The first extract gave a strong papain activation and was also fairly strongly activated by cysteine. The extract from the residue, however, had no influence upon papain and was very weakly activated by cysteine. The same was the case with the dialysed extract. During the dialysis precipitation occurred. The experiments indicate that the papain activating factor is easily extracted from the lyophilized material and that it disappears during the dialysis, possible because it is low molecular. The influence of calcium is in this connection of less interest.

Table 30

Activation of extract from lyophilized *Arbacia* eggs

Lyophilized, unfertilized *Arbacia* eggs were extracted (2.5 per cent dry weight) for 5 hours at $+3^{\circ}\text{C}$ with distilled water and centrifuged. The extract is called AX 58. The residue was suspended in H_2O , frozen and thawed, kept 15 hours at $+3^{\circ}\text{C}$ and centrifuged. This extract is called AX 58R. A part of AX 58 was dialysed against distilled water for 22 hours at $+^{\circ}\text{C}$ and then centrifuged. It is called AX 58D. 1.00 ml of resp. extract was treated for 1 hour at 18°C with 0.50 ml of resp. agents and then mixed with 3.00 ml gelatin. pH in all mixtures 6.7.

Exp No	Egg extract		Agent Conc.	m μ A/ml	m μ A/mgN	Rel. activity per	
	Prep	mgN/ml				ml	mgN
171	AX 58	1.16	H_2O	2.84	2.45	1.00	1.00
172	AX 58	1.16	Cysteine, HCl 0.003 M	133	115	46.8	46.8
173	AX 58	1.16	Papain ¹	3 410	2 940	348	96.1
174	Papain	0.32	H_2O	9.79	30.6	1.0	1.0
175	AX 58 R	0.20	H_2O	0	0		
176	AX 58 R	0.20	Papain ¹	16.2	81.0	1.65	2.65
177	AX 58 R	0.20	Cysteine, HCl 0.003 M	5.5	27.6		
178	AX 58 R	0.20	CaCl_2 0.1 M	4.27	21.4		
179	AX 58 D	0.69	H_2O	0	0		
180	AX 58 D	0.69	Papain ¹	40.0	58.0	4.09	1.90
181	AX 58 D	0.69	Cysteine, HCl 0.003 M	5.33	7.72		
182	AX 58 D	0.69	CaCl_2 0.1 M	0	0		

Discussion

The role of calcium in the cell and in enzymatic processes has been subject to extensive studies. In 1927 HEILBRUNN (13) observed a break down of cytoplasmic granules, when calcium was added to fresh egg homogenates. McDONALD and KUNITZ (33) studied the autocatalytic formation of trypsin from trypsinogen, which is accelerated especially by calcium. HEILBRUNN and co-workers (14) assume that release of calcium plays a decisive role in the process of activation of unfertilized eggs. LANSING (26) suggests that an organical calcium binding complex of the cell cortex participates in the regulation of the cell growth. From *Micrecoccus lys.* cultures, GORINI and FORMAGEOT (8) extracted a protease requiring calcium for enzymic activity. Calcium precipitating agents resulted in inactivation of the enzyme. Working with sea urchins, HULTIN reported a sudden oxygen uptake when calcium was added to *Psammechinus* egg homogenates, made from calcium free egg suspensions (18). Later, HULTIN found the same effect in homogenates from *Paracentrotus* eggs (19) and also an acid formation (20). These effects were inhibited by iodoacetate, which supports the hypothesis that thiol groups are involved. In the acid formation, calcium is supposed to act through a factor in the cell fluid, possibly of enzymatic nature. WOODWARD (54) designates the proteolytic enzymes he found in *Macra sol.* "I" and "II". Enzyme I with pH optimum 7.5–7.6 is present in small granules and in the clear supernatant, and can be activated by calcium ions. Enzyme II, with pH optimum 3.5–4.0 is associated with the granulefree supernatant and is apparently not affected by calcium ions. BIER and NORD (3) showed that calcium is an efficient protector for

¹ The relative activity of the papain treated extracts is referred to that of the untreated papain.

crystalline trypsin in alkaline solution. The effect is due to a decrease in the rate of autodigestion of trypsin. BENTLY (2) found recently that addition of calcium (or manganese) resulted in a 2-3 fold increase in the proteolytic activity of pancreas homogenates and GROSS (11) reported lytic action of calcium ions on the pigment granules of *Arbacia* eggs (cf. Hultin loc. cit.). In the present investigation calcium is found to increase the proteolytic activity in extracts and homogenates in most cases. A lower concentration of calcium (M/1000) in the incubated solution seems to have a stronger effect than a higher (M/10) concentration. The mechanism of the calcium action is as yet unknown. Hultin's work (vide supra) seems to support the idea that calcium liberates the sulfhydryl enzyme (E I). The present study shows that, when it was possible to activate with cysteine, this could generally be done also by means of calcium. Some exceptions (cf. Table 15) may be due to a too high concentration. However, the fractional homogenization of *Arbacia* eggs (Table 25) shows that the inactive extract from the supposed granular part of the cytoplasm could be made active by cysteine, but not by calcium.

The investigations reported above seem to indicate the presence of two enzymes (or enzyme systems) of different types in the unfertilized egg — one activated by cysteine or other thiol compounds, possibly of cathepsin II type (cf. (12)), here called E I, and another inactivated by cysteine, here called E II. The localization of these two enzymes in the egg is still rather uncertain, but some facts may be summarized. The results from experiments on lyophilized material and those from fresh homogenates seem to be contradictory. The kryolytic extraction of lyophilized eggs gave an activity decreased by cysteine, whereas the mild short extraction at +3° had given an extract, the activity of which was increased by cysteine. However, the results from experiments on homogenates show that when the eggs are treated with hypertonic solutions, a stronger activity than otherwise occurs, and this activity can be still more increased by means of cysteine. As hypertonicity is considered to break down some granular parts of the egg cytoplasm, this proteolytic effect may indicate that the granules (mitochondria), when attacked, give off a sulfhydryl dependent enzyme (E I). HOLTER (15), studying proteolytic enzymes in *Chaos chaos*, reported that proteinase was predominantly found in the heavier half of the cell at centrifugation, where the granular cytoplasmic inclusions are accumulated. GUSTAFSON (12) reports that among other enzymes cathepsin II is rising in activity during the embryonal development and concludes that this indicates localization in mitochondria. Now, it may be suggested that the kryolytic extraction acts on proteins of non-granular type difficult to dissolve, and thus liberates the enzyme, here called E II, inactivated by cysteine.

The inactivating effect of cysteine obtained in some cases (cf. Tables 5 and 16) seems to be of complicated nature. Without further comparison, the experiments on trypsin and chymotrypsin by PETERS et al. (40) may be mentioned. These enzymes were made inactive by means of thiol compounds and the inactivation was not reversed by S-S compounds. This is also the case for insulin, as noted by DU VIGNEAUD et al. (52), which is irreversibly inactivated by thiols. That inactivation is under certain circumstances followed by precipitation.

The activation of β -amylase by means of papain made by MYRBÄCK ((39) loc. cit.) stimulated this writer to try the effect of papain in the present investigations. As the results indicate, a powerful increase of the proteolytic activity in papain treated homogenates occurred which, however, must be attributed to an activation of the papain itself by its action upon the homogenate. This action is probably a denatura-

tion of proteins accompanied by a liberation — unmasking¹ — of thiol groups. PURR (41) found that papain was partially activated by treatment with washed muscles and attributed this effect to the fixed thiol groups. GOTTSCHALL (9) showed that papain, inactive in the usual tests, may be very active in the digestion of meat or other products, containing thiol groups or capable of producing such during proteolysis. HULTIN (20) reported that papain breaks down cytoplasmic granules when mixed with homogenates of eggs and it seems plausible that thiol groups are liberated in this way. Also the lysis of pigment granules of *Arbacia* eggs by means of calcium as reported by GROSS (11) may be due to a proteinase. The increase of proteolytic activity in the egg immediately after fertilization, as shown by the present writer and the increase of glutathione also occurring after fertilization or subsequent to beginning germination of seeds, as demonstrated by several authors, may be correlated.

The increase of glutathione one minute after fertilization of eggs from *Psammochinus miliaris* was reported already in 1922 by SHEARER (48). RAPKINE (42) investigated the radical SH in eggs from *Paracentrotus lividus* and found it to increase before the (first) cell division of fertilized eggs. However, RAPKINE also showed that 30 minutes after fertilization, there was a decrease in the SH-content compared with that of unfertilized eggs. Yet he did not investigate the eggs immediately after fertilization. He ascribes the increase of thiol groups to the denaturation of proteins. This denaturation may be the result of the proteolytic activity as reported by the present writer. HOPKINS and MORGAN (16) found an increase of the glutathione content of germinating seeds rapidly to reach a maximum. Thereafter there was a steady fall, as growth proceeded. An increase of the glutathione content of the ova of *Paracentrotus lividus* immediately after fertilization was followed by a decrease, as reported by INFANTELLINA and LA GRUTTA (22).

The great difference in activity between fresh homogenates and extracts from lyophilized material is noticeable in the present experiments. Also the great variations in activity of fresh homogenates give the impression that factors beyond control operate during the preparations.

Summary

1. The weak proteolytic activity in extracts from lyophilized unfertilized sea urchin eggs of the species *Arbacia lixula* is considerably increased by means of calcium or cysteine. The presence of cysteine during extraction in water seems also to increase the activity.

2. Lyophilized eggs, stored long time had no activity at short extraction but prolonged extraction time including freezing and thawing resulted in an active extract, the activity of which, however, was decreased by cysteine.

3. Plasmin inhibitor, Soy bean inhibitor and an extract from sea urchin eggs taken 50 minutes after fertilization caused strong inactivation.

4. Active sperm extracts did not activate egg extracts, but the egg enzyme decreased — after incubation — the relatively strong activity of the sperm extract.

5. The activation occurring after fertilization was again found in *Paracentrotus* and also in *Echinus*.

¹ Cf. the review of E. S. GUZMAN BARRON, *Advances in Enzymol.* XI, 201 (1951).

6. Homogenates from *Arbacia* and *Paracentrotus* were strongly activated by cysteine and increased the activity of an unactivated papain solution considerably.
7. Ficin could be activated like papain by homogenates, but the activity of a strong trypsin solution was decreased, as well as that of a strong sperm extract.
8. A couple of times a very strong activity was found in untreated homogenates. This activity disappeared rapidly and was almost abolished on addition of cysteine.
9. Different treatment of intact eggs before homogenization, resulted in homogenates with different qualities with respect to activity, influence of cysteine and influence on papain.
10. Some experiments on fractionated homogenization and extraction were made.

The author wishes to express his gratitude to Professor J. RUNNSTRÖM for the great interest he has shown in this work and for several suggestions and to Professor K. MYRBÄCK for valuable criticisms and discussions.

His thanks are also due to the Director of the Zoological Station at Naples, Professor R. DOHRN and to Dr. G. GUSTAFSSON, head of the Zoological Station, Kristineberg.

He further wants to thank Miss G. BERLEEN and Eng. Å. STENHARDT for technical assistance and Eng. S. LINDVALL for practical information.

The investigations were financially supported by grants from the Swedish Natural Science Research Council awarded to the Wenner-Gren Institute and by scholarships from Ahlstrandska Fonden and Stiftelsen Lars Hiertas Minne, which is hereby gratefully acknowledged.

From the Wenner-Gren Institute for Exp. Biology, University, Stockholm.

- REFERENCES. 1. Balls, A. K., and Hale, W. S., *Cereal Chem.*, 15, 622 (1938). — 2. Bentley, O. G., *Federation Proc.*, 10, 161 (1951). — 3. Bier, M., and Nord, F. F., *Arch. Biochem. Biophys.*, 33, 320 (1951). — 4. Borger, G., und Peters, T., *Z. physiol. Chem.*, 214, 91 (1933). — 5. Danielsson, C. E., *Acta Chem. Scand.*, 5, 541 (1951). — 6. — *Acta Chem. Scand.*, 5, 791 (1951). — 7. Emanuelsson, H., *Nature*, 168, 958 (1951). — 8. Gorini, L., et Formageot, C., *Compt. rend.*, 229, 559 (1949). — 9. Gottschall, G. Y., *Food Research*, 9, 6 (1944). — 10. Grob, D., *J. Gen. Physiol.*, 29, 219 (1946). — 11. Gross, P. R., *Biol. Bull.*, 101, 209 (1951). — 12. Gustafson, T., and Hasselberg, I., *Exptl. Cell Research*, 2, 642 (1951). — 13. Heilbrunn, L. V., *Arch. exptl. Zellforsch. Gewebezücht.*, 4, 246 (1927). — 14. — *An Outline of General Physiology*. Philadelphia 1945. — 15. Holter, H., et Lövtrup, S., *Compt. rend. trav. lab. Carlsberg. Sér. chim.* 27 nr 2, 27 (1949). — 16. Hopkins, F. G., and Morgan, E. J., *Nature*, 152, 288 (1943). — 17. Hultin, E., *Svensk Kem. Tid.*, 60, 40 (1948). — 18. Hultin, T., *Arkiv Kemi, Mineral., Geol.*, 26 A, No 27 (1949). — 19. — *Exptl. Cell Research*, 1, 159 (1950). — 20. — *Exptl. Cell Research*, 1, 272 (1950). — 21. Hörstadius, S., *Pubbl. staz. zool. Napoli*, 14, 263 (1935). — 22. Infantellina, F., e La Grutta, G., *Boll. soc. ital. sper.*, 23, 492 (1947). — 23. Irwing, G. W., Fruton, J. S., and Bergmann, M., *J. Biol. Chem.*, 144, 161 (1944). — 24. Krebs, H. A., *Biochem. Z.*, 238, 174 (1931). — 25. Labarre, J., et Pfeffer, S., *Rev. can. biol.*, 5, 233 (1946). — 26. Lansing, A. I., *Science*, 106, 187 (1947). — 27. Linderstrøm-Lang, K., og Sato, M., *Medd. Carlsberg Lab.*, 17, No 17 (1929). — 28. Lundblad, G., *Abstr. Comm. 1st Internat. Congr. Biochem. Cambridge 1949* p. 583. — 29. — *Nature*, 163, 643 (1949). — 30. — *Exptl. Cell Research*, 1, 264 (1950). — 31. — *Acta Chem. Scand.*, 4, 1075 (1950). — 32. Maschmann, E., *Z. hysiol. Chem.*, 228, 141 (1934). — 33. McDonald, M. R., and Kunitz, M., *J. Gen. Physiol.*, 25, 53 (1941/2). — 34. Mergentime, M., and Wiegand, E. H., *Fruit Products J.*, 26, 72 (1946). — 35. Mertz, E. T., and Owen, C. A., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 43, 204 (1940). — 36. Mill, C. K., og Linderstrøm-Lang, K., *Medd. Carlsberg Lab.*, 17, No 10 (1929). — 37. Mounfield, D. J., *J. Biochem.*, 30, 549 (1936). — 38. Myrbäck, K., and Myrbäck, S., *Biochem. Z.*, 258, 158 (1933); 285, 282 (1936). — 39. Myrbäck, K., and Örténblad, B., *Enzymologia*, 2, 305 (1938); 7, 176 (1939). — 40. Peters, R. A., Wakelin, R. W., and Cecil, R., *Biochem. J.*, 43, 45 (1948). —

41. **Purr, A.**, *Biochem. J.*, 29, 13 (1935). — 42. **Rapkin, L.**, *Compt. rend.*, 191, 871 (1930); *Ann. physiol. physicochim. biol.*, 7, 382 (1931). — 43. **Roca, J.**, e **Ondarza, R.**, *Anales inst. biol. (Univ. naci. Méx.)*, 19, 283 (1948). — 44. **Runnström, J.**, *Biol. Bull.*, 69, 351 (1935). — 45. — Exptl. Cell Research, Suppl. 1, 469 (1949). *Proc. 6th Intern. Congr. Exptl. Cytol.* (1947). — 46. — *The Mechanism of Fertilization in Metazoa, Advances in Enzymol.* IX, 241 (1949). — 47. **Runnström, J.**, and **Kriszat, G.**, *Exptl. Cell Res.* 3, 500 (1952) — 48. **Shearer, C.**, *Proc. Roy. Soc. Ser. B.*, 93, 213 (1922). — 49. **Thimann, K. V.**, and **Bonner, W. D.**, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 35, 272 (1949). — 50. **Tyler, A.**, *Collecting Net*, 19, No 1, 19 (1949). 51. **Waldschmidt-Leitz, E.**, *et al.*, *Z. physiol. Chem.*, 203, 117 (1931); *Naturwissenschaften*, 20, 254 (1932). — 52. **Vigneaud, V. du, Fitch, A., Pekarek, E.**, and **Lockwood, W. W.**, *J. Biol. Chem.*, 94, 233 (1931). — 53. **Woodward, A. A. Jr.**, *Biol. Bull.*, 97, 264 (1949). — 54. — *Biol. Bull.*, 99, 367 (1950).

Tryckt den 10 november 1952

Uppsala 1952. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB

Activity-pH-curves of the enzymatic saccharose and raffinose hydrolysis

By KARL MYRBÄCK and ULLA BJÖRKLUND

With 3 figures in the text

L. MICHAELIS was the first to observe the similarity between the activity-pH-curves of certain enzymes and the dissociation curves of amphoteric electrolytes. MICHAELIS and DAVIDSOHN (1) introduced the idea that the enzymes are ampholytes, the uncharged molecules of which are enzymatically active. The validity of this assumption was investigated in the case of yeast saccharase (invertase); the authors found that the alkaline branch of the saccharase pH-curve coincides with the dissociation curve of a weak acid with K_a = about $10^{-6.6}$. Consequently they assumed that in the active saccharase molecule an acidic group with this K_a -value must be undissociated. It was supposed that the acid branch of the saccharase pH-curve could be, in principle, explained in the same way, *i.e.* as the dissociation curve of a basic group of the enzyme molecule. However, this part of the curve was not investigated in detail.

After MICHAELIS and MENTEN (2) had introduced the hypothesis of the formation of enzyme-substrate compounds according to the mass action law, MICHAELIS and ROTHSTEIN (3) supposed that the activity-pH-curve of saccharase is the dissociation curve of the enzyme-substrate compound. This theory was heavily criticized by KUHN (4).

From studies on the activity-pH-curves at different substrate (saccharose) concentrations and on the inactivation of saccharase at different acidities by specific reagents, one of us (5) was able to draw the following conclusions regarding the acidic and basic groups of the saccharase molecule:

a. the enzyme is an ampholyte, possessing dissociating groups characterized by the following approximate values: $K_a = 10^{-6.6}$; $K_b = 10^{-11}$;

b. the acidic group(s) has nothing to do with the attachment of the substrate to the enzyme, but the *uncharged* acidic group of the enzyme is, as supposed by MICHAELIS, essential to the enzyme action;

c. a basic group (or groups) with K_b approximately $= 10^{-11}$ is a primary amino group which, possibly together with other groups of the enzyme molecule, is mediatory in the combination of enzyme and substrate;

d. only the uncharged basic group, for convenience's sake designated $-NH_2$, and not the corresponding cationic group, $-NH_3^+$, can combine with the substrate.

The relative activity of the enzyme at any pH and any substrate concentration should then be expressed by the equation:

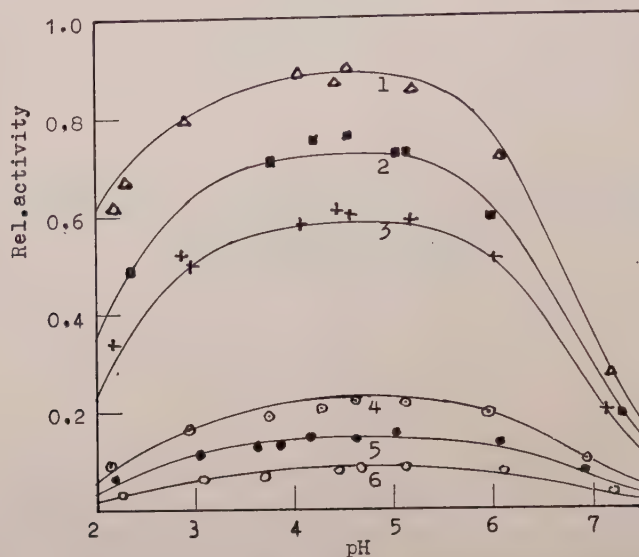


Fig. 1. Activity-pH-curves of the enzymatic hydrolysis of saccharose (curves 1-3) and raffinose (curves 4-6) at different substrate concentrations.

$$(I) \quad \text{Rel. activity} = \frac{v}{v_{\max}} = \frac{1}{(1 + K_a / [H^+]) \cdot [1 + K_m / [S] \cdot (1 + K_b / [OH^-])]}.$$

The calculated values were shown to agree very well with the experimental data of the enzymatic saccharose hydrolysis.

In formula (I) K_m is the so-called *Michaelis constant*, and $[S]$ is the substrate concentration. K_m is the *dissociation constant* of the enzyme-substrate compound, the value of which, $K_m = \frac{v_{\max} - v}{v} \cdot [S]$, was derived by MICHAELIS and MENTEN from the assumption that enzyme and substrate combine according to the mass action law:

$$K_m = \frac{(\Sigma - [ES]) \cdot [S]}{[ES]}$$

where Σ is the total enzyme concentration and $[ES]$ is the concentration of the enzyme-substrate compound.

Since the pioneer work of MICHAELIS a great many K_m -values for various enzymes have been determined. An ingenious method for the calculation of the constant from experimental data has been devised by LINEWEAVER and BURK (6).

However, in several cases authors have pointed out that the K_m -values are not independent of the pH. Certain authors have gone as far as to doubt, for that reason, the importance of the K_m -values for the characterization of enzymes (KUHN (4); VAN SLYKE (7)). It must be remembered, however, that the authors, when speaking of a variation of K_m with pH, tacitly assume that the amount of the enzyme which is able to combine with the substrate does not vary with pH. Since the enzymes

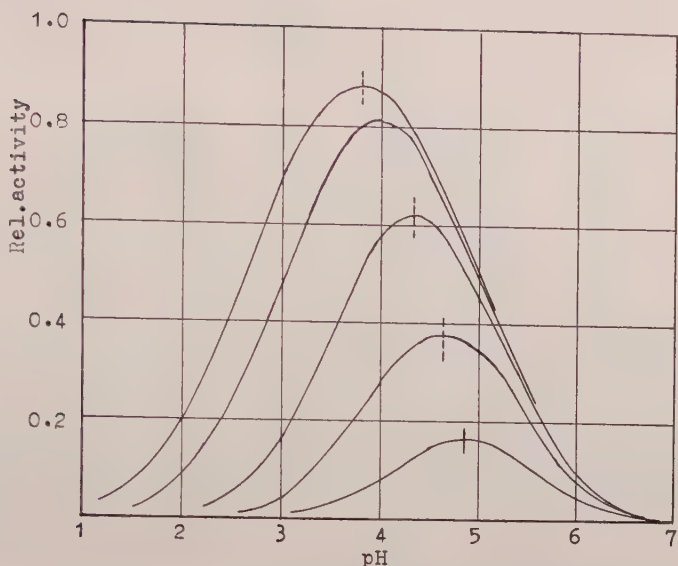


Fig. 2. Activity-pH-curves of an enzyme with a substrate-binding basic group ($K_a=10^{-5}$, $K_b=10^{-9}$, $K_m=10^{-2}$) at different substrate concentrations.

are proteins, possessing the usual acidic and basic groups, they clearly must alter their electrical charge with pH, and it can certainly not be regarded as self-evident that enzyme ions and uncharged enzyme molecules should alike combine with the substrate. As already mentioned, it was found that, in the case of saccharase, the isoelectric enzyme molecules and the enzyme anions combine with the substrate whereas the cations apparently do not because the (or a) basic group of the enzyme mediates the attachment of the substrate. It is most interesting to note that the same seems to be valid for several other hydrolyzing enzymes, *e.g.* for urease (8), certain amylases (9) and cholinesterase (10).

It is readily seen from formula (I) that, if K_m for saccharase is calculated from experiments in the usual way, it is found to vary with pH. (It is, of course, immaterial if the constant is calculated as done originally by MICHAELIS or according to the method of LINEWEAVER and BURK.) If a saccharase preparation has $K_m=0.026$, $K_a=10^{-6.8}$ and $K_b=10^{-11.4}$ (values found in this investigation, see below), then the theoretical pH-curves 1-3 in fig. 1, valid for the substrate concentrations $[S]=0.0374$, 0.0674 and 0.2045 , are calculated from formula (I). If an apparent K_m -value for saccharase is calculated from these curves at different acidities, the following values are obtained:

at pH=2, apparent $K_m=0.129$	
3	0.036
4	0.027
5	0.026
6	0.026
7	0.026

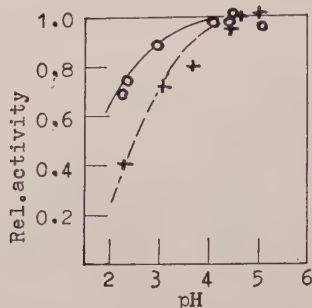


Fig. 3. pH-curves of the hydrolysis of 0.2045 *M* saccharose (O) and of 0.0311 *M* raffinose (+).

Evidently the correct value (0.026) is obtained only in the pH-range on the alkaline side of the activity optimum, *i.e.* where the dissociation of the substrate-binding basic group(s) is negligible. As pointed out before (9), the K_b of the substrate-binding group need not necessarily be equal to the average K_b of the enzyme protein as a whole.

This example shows already that the true K_m -value of an enzyme cannot always be calculated in the usual way, *i.e.* from experiments at different substrate concentrations and at one and the same pH, usually in the neighbourhood of the pH-optimum. In order to arrive at a dependable K_m -value, one has to carry out series of experiments at different acidities. If a constant (minimum) value is obtained in a wide range of pH, then it can be regarded as the correct value. However, cases may very well exist, where K_a and K_b of an enzyme are such that the correct K_m -value is obtained only at acidities rather far from the pH-optimum. (It may even very well be that K_m cannot be determined experimentally at all, because the determinations should be carried out at acidities where the enzyme is practically inactive.) Take *e.g.* an enzyme with $K_a=10^{-5}$, $K_b=10^{-9}$ and $K_m=10^{-2}$, *i.e.* quite reasonable values. If the basic group of this enzyme is the substrate-binding one and, accordingly, formula (I) is valid, then the enzyme will have the activity-pH-curves shown in fig. 2 at the substrate concentrations $[S]=0.01, 0.05, 0.2, 1.0$ and 2.5. The optimal zones are, of course, rather narrow and the position of the optimum varies strongly with the substrate concentration. The position of the pH-optimum at a substrate concentration $[S]$ can be found from the equation

$$(II) \quad [H_{\text{opt}}^+]^2 = \frac{K_a \cdot K_w}{K_b} \cdot \frac{K_m + [S]}{K_m}$$

(pH-curves of this type are exhibited *e.g.* by urease.) If the apparent K_m -values of the enzyme are calculated in the usual way, we find

at pH=4, apparent K_m -value=	0.122
5	0.020
6	0.011
7	0.010
8	0.010

i.e., the correct value (0.010) is obtained only at acidities where the enzyme activity is less than 10 per cent of the optimum value.

The identity of saccharase and *raffinase*, tentatively assumed as early as in 1896 by EMIL FISCHER, was proved by KUHN (4). Undoubtedly one and the same enzyme is responsible for the hydrolysis of both sugars by yeast preparations, but the affinity of the enzyme for raffinose is much lower than that for saccharose. KUHN found the pH-optimum of raffinose hydrolysis to be about the same as that of saccharose hydrolysis; the alkaline branches of the pH-curves were found to be identical in both cases. If this branch of the curves is the dissociation curve of a weakly acidic group of the enzyme and if this acidic group is not involved in the binding of the substrates, it is clearly to be expected that the pH-curves of saccharase and raffinase should coincide on the alkaline side of the pH-optimum. If, on the other hand, the binding of the substrates is mediated by a basic group, the pH-curves of saccharase and raffinase should have different positions in the acid region because of the different affinities between the enzyme and the two substrates. KUHN found certain differences between the pH-curves on the acid side of the optimum, but the curves were not investigated in detail in this region, which probably is the explanation for the erroneous statement made by KUHN, that the equilibrium between saccharase and its substrates is independent of the pH and that the H^+ -ions determine the rate of disintegration ("Zerfallsgeschwindigkeit") of the enzyme-substrate compound.

If the explanation of the pH-curves of the enzymatic saccharose inversion quoted in the introduction to this paper is correct, it should, of course, allow the calculation of the pH-curves of the raffinose hydrolysis as well, provided that K_r , *i.e.* the dissociation constant of the saccharase-raffinose compound is known. Since the enzyme has approximately the K_a - and K_b -values given above, a calculation of K_r in the usual way at the pH-optimum of the raffinose hydrolysis or on the alkaline side of it, *i.e.* at $pH > 5$, should yield a reliable result. We have therefore determined K_s (dissociation constant of the saccharase-saccharose compound) and K_r , and, furthermore, we have investigated the pH-curves of the two reactions at different sugar concentrations.

Enzyme preparation. A partly purified preparation from baker's yeast was used throughout the investigation. The preparation was stored under toluene in the ice box and was quite stable.

Buffer solutions. Mixtures of 2 *N* acetic acid and 2 *N* sodium acetate were used. For extreme pH-values small amounts either of HCl or of NaOH had to be added. The composition of the buffers for different pH-values is seen in table 1. Final buffer concentration in the assay mixtures 0.2 *N* acetic acid; obviously the ionic strength is not constant.

Determination of reaction rate. 10 ml buffer was mixed with sugar solution and water up to 95 ml, brought to 25° in a water thermostate and then mixed with 5 ml enzyme solution. After suitable reaction times samples of 10 ml were pipetted into 5 ml 10 per cent sodium carbonate solution. The reaction was stopped and a stable rotation value was obtained immediately in the alkaline mixture. The polarimetric value of each sample was determined in 2 dm tubes. All values were corrected for the (very low) rotation of the enzyme preparation. pH was determined with the glass electrode in every assay mixture.

It was found that the hydrolysis of both sugars at all acidities investigated, followed the monomolecular formula rather closely. This is certainly to be regarded

Table 1

Approximate pH-value	ml acetic acid	ml NaAc
2.0	10	0 (+ HCl)
3.0	10	0
4.0	8	2
4.5	6	4
5.2	2	8
6.0	0	10
7.0	0	10 (+ NaOH)

Table 2

5 ml enzyme; 0.0674 M saccharose. pH = 4.47			10 ml enzyme; 0.0687 M raffinose. pH = 3.62		
Minutes	Rotation	$k \cdot 10^3$	Minutes	Rotation	$k \cdot 10^3$
0	+ 2.06	—	0	+ 4.82	—
4	1.41	30.8	15	4.54	3.71
6	1.15	30.4	30	4.30	3.68
8	0.93	30.1	45	4.09	3.65
10	0.72	30.5	60	3.91	3.60
12	0.53	31.1	75	3.76	3.54
14	0.36	31.8	90	3.63	3.46
16	0.24	31.5	120	3.41	3.39
	- 0.59	—		+ 2.50	—
Mean value: $k = 31.5 \times 10^{-3}$			Mean value: $k = 3.58 \times 10^{-3}$		
Reaction rate: $v = 2.12 \times 10^{-3}$			Reaction rate: $v = 0.246 \times 10^{-3}$		

Table 3

Saccharose		Raffinose	
1/S	1/v	1/S	1/v
26.75	640	32.15	15 100
26.75	621	32.15	14 500
26.75	613	32.15	14 000
24.45	614	17.15	8 500
14.85	514	17.15	8 250
14.85	496	17.15	7 850
14.85	495	10.00	5 800
14.85	490	10.00	5 600
12.23	503	10.00	4 850
8.16	456		
6.11	450		
4.89	414		
0	370	0	1 200
$v_{\max} = 2.70 \times 10^{-3}$		$v_{\max} = 0.833 \times 10^{-3}$	
$K_s = 0.0259$		$K_r = 0.346$	

Table 4

Velocity of saccharose hydrolysis

[S] = 0.0374			[S] = 0.0674			[S] = 0.2045		
pH	$v \cdot 10^3$	$v/v_{\max}$	pH	$v \cdot 10^3$	$v/v_{\max}$	pH	$v \cdot 10^3$	$v/v_{\max}$
2.14	0.91	0.34	2.34	1.33	0.49	2.22	1.67	0.62
2.84	1.39	0.52	3.73	1.92	0.71	2.32	1.82	0.67
2.97	1.35	0.50	4.20	2.03	0.75	2.95	2.12	0.79
4.08	1.56	0.58	4.54	2.04	0.76	4.04	2.38	0.88
4.45	1.64	0.61	5.02	1.94	0.72	4.46	2.36	0.87
4.56	1.61	0.60	5.14	1.95	0.72	4.52	2.43	0.90
5.18	1.60	0.59	5.98	1.56	0.58	5.18	2.28	0.85
6.02	1.38	0.51	7.29	0.52	0.19	6.04	1.71	0.71
7.16	0.53	0.20				7.13	0.72	0.27

Table 5

Velocity of raffinose hydrolysis

[S] = 0.0311			[S] = 0.0583			[S] = 0.1001		
pH	$v \cdot 10^3$	$v/v_{\max}$	pH	$v \cdot 10^3$	$v/v_{\max}$	pH	$v \cdot 10^3$	$v/v_{\max}$
2.25	0.027	0.032	2.18	0.054	0.065	2.16	0.076	0.091
3.07	0.050	0.060	3.03	0.090	0.108	2.96	0.133	0.160
3.72	0.056	0.067	3.62	0.104	0.125	3.75	0.152	0.182
4.43	0.066	0.079	3.86	0.109	0.131	4.27	0.164	0.196
4.66	0.069	0.083	4.14	0.121	0.145	4.61	0.178	0.214
5.12	0.071	0.085	4.63	0.117	0.140	5.13	0.171	0.205
6.08	0.064	0.077	5.02	0.128	0.154	5.96	0.159	0.191
7.21	0.030	0.036	6.07	0.113	0.136	6.91	0.084	0.101
			6.91	0.066	0.079			

as a coincidence (11); nevertheless the formula may be used to calculate the reaction rate. 6–10 polarimetric readings were made in each experiment; the mean value of the corresponding monomolecular coefficients was taken. If this value is k and the substrate concentration is $[S]$, then the expression $v = k \cdot [S]$ can be used for comparing the true velocities at different substrate concentrations. In order to show the constancy of the k -values two experiments are described in table 2.

Determination of the Michaelis constants. The constants K_s and K_r were determined in series of experiments at different substrate concentrations. In the experiments with saccharose the pH was about 4.5, in those with raffinose about 5.1. $v_{\max}$ and the constants were determined graphically according to LINEWEAVER and BURK (Table 3). The ratio K_r/K_s is 13.4, in good agreement with the values found by KUHN (4).

Determination of activity-pH-curves. Experiments at different substrate concentrations and different acidities were carried out as described above. 6–10 polarimetric readings were taken in each experiment and the average monomolecular constant k was calculated. The reaction velocities ($v = k \cdot [S]$) are collected in tables 4 and 5.

In fig. 1 the curves 1-3 are the activity-pH-curves of the saccharose hydrolysis as calculated from formula (I) and the following values for the various constants: $K_a = 10^{-6.8}$ (value found by KUHN), $K_b = 10^{-11.4}$, and $K_s = 0.0259$ (as found in this investigation). The curves 1-3 correspond to the substrate concentrations mentioned in table 4. The curves 4-6 are the corresponding theoretical activity-pH-curves of the raffinose hydrolysis at the substrate concentrations mentioned in table 5. These curves have been calculated from formula (I) and the same K_a - and K_b -values as in the case of the saccharose hydrolysis; for K_m , however, the value $K_r = 0.346$ was used. The relative velocities of the saccharose and raffinose hydrolysis, found in the experiments, are marked by crosses etc. in fig. 1. The agreement can be considered to be very good.

This result could be foreseen for the alkaline branches of the curves since KUHN and others found this part of the curves to be independent of the substrate concentrations and to be the same for saccharose and raffinose. On the acid side of the pH-optimum, however, the curves vary with K_m and substrate concentration, and the good agreement between the experiments and the theoretical curves must be regarded as a strong evidence for the validity of formula (I) not only for saccharose hydrolysis but for the hydrolysis of raffinose as well. Since the K_m -values of the two enzyme-substrate compounds are widely different, the curves differ strongly in the acid region as can be seen more clearly in fig. 3. Here the theoretical curves for the hydrolysis of 0.2045 *M* saccharose and 0.0311 *M* raffinose have been drawn so that $v_{\max} = 1$ in both cases.

SUMMARY

The activity-pH-curves of the enzymatic hydrolysis of saccharose and raffinose by yeast saccharase can be calculated under the assumption that the enzyme is an ampholyte (protein) containing certain essential groups. The attachment of the substrates to the enzyme molecule is mediated by a basic group of the latter having $K_b = \text{about } 10^{-11.4}$. Only the uncharged group (probably a primary amino group, $-\text{NH}_2$), and not the corresponding cationic (ammonium) group, has an affinity for the substrates. An acidic group of the enzyme molecule ($K_a = 10^{-6.8}$) is essential for the disintegration of the enzyme-substrate compounds, but does not belong to the substrate-binding groups. These simple assumptions allow the calculation of the activity-pH-curves for both substrates and all substrate concentrations according to formula (I).

Institute for Organic Chemistry and Biochemistry, University, Stockholm.

REFERENCES: 1. Michaelis, L. und Davidsohn, H., *Biochem. Z.* 35, 286 (1911). — 2. Michaelis, L. und Menten, L., *Biochem. Z.* 49, 333 (1913). — 3. Michaelis, L. und Rothstein, M., *Biochem. Z.* 110, 217 (1920). — 4. Kuhn, R., *Z. physiol. Chem.* 152, 28 (1923). — 5. Myrbäck, K., *Z. physiol. Chem.* 158, 160 (1926). — 6. Lineweaver, H. and Burk, D., *J. Am. Chem. Soc.* 56, 658 (1934). — 7. van Slyke, D. D., *Adv. Enzymol.* 2, 33 (1942). — 8. Myrbäck, K., *Acta Chem. Scand.* 1, 142 (1947). — 9. Myrbäck, K., *Arkiv Kemi* 3, 437 (1951). — 10. Wilson, I., *Biochim. et Biophys. Acta* 7, 466 (1951). — 11. Sumner, J. B. and Myrbäck, K., *The Enzymes*, Vol. I, p. 27, Academic Press Inc. New York 1950.

Tryckt den 3 november 1952

Uppsala 1952. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB